Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER - PASADENA, **E. BÜNNING** - TÜBINGEN, **A. ERNST** - ZÜRICH
H. v. GUTTENBERG - ROSTOCK, **R. HARDER** - GÖTTINGEN
W. SCHUMACHER - BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

47. BAND, 4. HEFT

MIT 30 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 13. JULI 1956)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

Planta (Berl.)

Preis DM 22.–

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland, H. Winkler*. Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Otto Renner*, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67*.

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 279 01

---

47. Band **Inhaltsverzeichnis** 4. Heft

Seite

SPRECHER, E., Beiträge zur Frage der Biogenese sekundärer Pflanzenstoffe der Weinraute (Ruta graveolens L.). Mit 1 Textabbildung 323

GEITLER, L., Automixis, Geschlechtsbestimmung und Pyknose von Gonenkernen bei Cymbella aspera. Mit 4 Textabbildungen 359

SANDER, H., Studien über Bildung und Abbau von Tomatin in der Tomatenpflanze. Mit 2 Textabbildungen 374

MAYER, L., Wachstum und Organbildung an in vitro kultivierten Segmenten von Pelargonium zonale und Cyclamen persicum. Mit 23 Textabbildungen 401

Planta, Bd. 47, S. 323—358 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe

BEITRÄGE ZUR FRAGE DER BIOGENESE SEKUNDÄRER PFLANZENSTOFFE DER WEINRAUTE (RUTA GRAVEOLENS L.)

Von

EWALD SPRECHER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 26. März 1956)

Während die Vorgänge des Grundstoffwechsels überall ziemlich ähnlich verlaufen, führen die sekundären Prozesse (PAECH 1950) zu den verschiedensten Pflanzeninhaltsstoffen. Trotz der Mannigfaltigkeit derselben zeigt sich jedoch immer mehr, daß ihre Entstehung aus dem allgemeinen Stoffwechsel heraus auf wenige Punkte zurückgeführt werden kann; für verschiedene Stoffklassen kann man geradezu von Aufbaueinheiten sprechen. Es lag daher nahe, charakteristische Stoffwechselprodukte einer Pflanze unter diesen Gesichtspunkten zu bearbeiten. Die Weinraute (Ruta graveolens L.) schien besonders deshalb geeignet, weil hier die Inhaltsstoffe ätherisches Öl und Rutin leicht zu erfassen sind.

Methodik

I. Ätherisches Öl

Untersuchungen zur Entstehung des MNK (Methylnonylketon)

a) Keimung der Samen. Der Boden eines 1000 cm^3-Erlenmeyerkolbens wurde mit 7 Lagen Filtrierpapier bedeckt, dieses mit 25 cm^3 dest. Wassers getränkt und der Kolben mit einem Wattepfropfen verschlossen. In die so vorbereiteten und sterilisierten Kolben kamen unter sterilen Bedingungen je 10 g der wegen der starken Verpilzung kurz vorher desinfizierten Samen. Diese waren 8 Minuten mit einer Lösung von 1% $HgCl_2$ und 1% Saponin behandelt und mit sterilem Wasser abgespült worden.

Die Gefäße kamen dann an einen dunklen Ort, da die Weinraute ein Dunkelkeimer ist (KINZEL 1913 u. 1920). Bei optimaler Temperatur von etwa 15° erfolgte die Keimung nach einer Woche.

b) Bestimmung des Fettgehaltes. Die ruhenden bzw. angekeimten Samen wurden mit feinem Sand verrieben und mit Petroläther (bis 40° siedend) in einer Soxhletapparatur ausgezogen. Nach etwa 3 Wochen gab der Rückstand mit Scharlach R oder Sudan III keine Färbung mehr und die Extraktionsflüssigkeit blieb fettfrei. In einer Kontrolle wurden gleichzeitig Feuchtigkeitsgehalt und flüchtige Substanzen festgestellt, indem die Samen bei 102° bis zur Konstanz getrocknet wurden. Der Fettgehalt wurde auf Trockengewicht bezogen, das 91—92% von lufttrockenen Samen betrug.

Frische Blätter wurden erst mit Weingeist, dann mit Petroläther (bis 40° siedend) verrieben und ausgezogen. Die vereinigten Flüssigkeiten wurden bei möglichst niederer Temperatur vom Lösungsmittel befreit, die weingeistlöslichen Bestandteile abgetrennt und der petrolätherlösliche Rückstand der Chromatographie unterworfen.

e) Kennzahlen. Diese wurden nach den Vorschriften von MEARA (1954) bestimmt, die Jodzahl nach der Methode von WIJS.

d) Isolierung und Identifizierung der Fettsäuren. Nach GRÜN (1925) wurde die Linolensäure als Hexabromid,
die Linolsäure als Tetrabromid,
die Ölsäure als Dioxystearinsäure und
die Stearinsäure über ihr Bleisalz isoliert
und durch Schmelzpunkt identifiziert.

e) Fettsäurechromatographie. Hierbei kamen 2 verschiedene Methoden zur Anwendung: a) nach MICHEEL und SCHWEPPE (1954) mit acetyliertem Papier SS 2043 b Gl. und

b) nach KAUFMANN und NITSCH (1954), wobei als Imprägnierungsmittel Petrol spezial purum der Firma Fluka mit einem KP von 180—220° diente.

Entwickelt wurde bei der ersten Methode durch Bildung von Eisen III-Komplexen mit den Hydroxamsäuren, bei der zweiten Methode durch Bildung und Nachweis von Kupferseifen.

Als Kontrollsubstanz lief in jedem Fall allein und in Mischung Laurinsäure (Roth) mit.

f) Stärke. Weder in wäßrigen noch in alkalischen Auszügen (WEHLAU 1954) des entfetteten Samenmaterials konnte mit Jodjodkalium Stärke nachgewiesen werden.

g) Zucker. Die geringen Mengen ließen lediglich eine Feststellung über die Chromatographie zu. Als Lösungsmittel dienten verschiedene, in der Tabelle aufgeführte Gemische. Die genannten R_f-Werte sind Mittelwerte und dienen nur als Anhaltspunkte. Die Identifizierung erfolgte durch Kontrollsubstanzen, bei Di- und Trisacchariden auch durch Nachweis der Hydrolysenprodukte.

Entwickelt wurde in der Regel mit Anilinphthalat und Naphtoresorcin/Trichloressigsäure, ferner mit Jod und Phenylendiamin (CRAMER 1953).

Extrahiert wurde das fettfreie Material mit 70%igem Alkohol.

Die Hydrolyse der Oligosaccharide erfolgte durch 10—20 Minuten langes Kochen mit 0,02 n H_2SO_4 auf dem Wasserbad. Nach dem Erkalten wurde dann mit $BaCO_3$ neutralisiert.

Tabelle 1. *R_f-Werte der Zucker*

	n-Butanol 4 Essigsäure 1 Wasser 5	Phenol 1 Wasser 1 (untere Phase)	Acetessigester 1 n-Propanol 7 Wasser 2	Pyridin 1 Acetessigester 2 Wasser 2
Saccharose	0,14	0,39	0,15	0,175
Raffinose	0,05	0,29	0,04	0,083
Glucose	0,17	0,31	0,23	
Fructose	0,23	0,50	0,27	
Rhamnose	0,36	0,50	0,46	

Messung und Zählung der Sekretdrüsen. Die Keimpflanzen wurden in Petrischalen auf feuchtem Fließpapier gezogen und nach der Keimung z.T. im Dunklen belassen, z.T. ans Tageslicht gebracht. Die Ergebnisse waren in beiden Fällen — abgesehen von dem etiolierten Wachstum — analog.

Die Keimblätter mußten, soweit sie sich noch in der Samenschale befanden, mit Hilfe von Präpariernadeln von dieser und eventuell anhaftendem Endosperm befreit werden.

Die Sekretbehälter sind unter dem Mikroskop — vor allem im ausgewachsenen Zustand des Organs — als durchscheinende gelbe Flächen zu sehen. Enthalten sie Sekret, zeigen sie einen meist kreisrunden, gelben Inhalt, der sich im fort-

geschrittenen Stadium mit Jodjodkalium braun färbt und der bereits bei leichtem Druck austreten kann.

Die Zählung der Drüsen erfolgte bei 100facher, die Messung — sofort nach dem Präparieren — bei 240facher Vergrößerung mit Hilfe eines Meßokulars.

Messung an Kernen von Sekretbehältern. Zur Untersuchung kam Material von Hypokotyl, Blattstengel und Blattspreite der Keimpflanzen. Als bestes Objekt erwies sich das Hypokotyl. Die Messungen wurden durchgeführt an Quetschpräparaten, die nach Carnoy fixiert und dann 2—4 Tage mit Karminessigsäure + $FeCl_3$ angefärbt wurden. Da die Kerne ein Ellipsoid bilden, wurden größte Länge und größte Breite gemessen, unter jeweiliger Berücksichtigung von Behältern mit gleich starker Quetschung. Andere Sekretdrüsen ergaben mit größeren bzw. kleineren Zahlenwerten vergleichbare Verhältnisse.

Tabelle 2. *Kerngröße von Sekretbehältern in Teilstrichen*
(1 Teilstrich = 2 μ)

4 n	2 n	4 n	2 n	4 n	2 n
7×5	6×3	7×5	6×3	6×6	3×6
8×5	6×3	7×5	6×3	7×6	4×4
6×6	7×3	7×7	6×3	8×6	6×3
7×5	6×2	7×5	5×2	7×5	5×4
8×7	7×2	8×5	6×3	6×6	6×3
$7{,}2 \times 5{,}6$	$6{,}4 \times 2{,}6$	$7{,}2 \times 5{,}4$	$5{,}8 \times 2{,}8$	$6{,}8 \times 5{,}8$	$4{,}8 \times 4{,}0$
7×6	6×3	7×5	6×3		
7×5	6×2	8×6	6×2	Durchschnittsverhältnis:	
7×5	6×3	6×6	6×3	2n $5{,}8 \times 3{,}0$; 4n $7{,}1 \times 5{,}7$;	
7×7	6×3	8×6	6×2	2n 0,4 mm^3; 4n 1,2 mm^3	
7×6	6×3	7×6	6×3		
$7 \times 5{,}8$	$6 \times 2{,}8$	$7{,}2 \times 5{,}8$	$6 \times 2{,}6$		

Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl. Um die dazu notwendigen Voraussetzungen zu ermitteln, wurden ausgedehnte Vorversuche durchgeführt, deren Ergebnisse die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen bildeten.

1. Das Destillationsgut wurde immer morgens zwischen 9 und 10 Uhr gleichzeitig und möglichst rach gesammelt, gewogen und in die Destillationsapparatur gebracht. Für Vergleichzwecke und gleiche Mengen wurden immer dieselben Kolbengrößen benützt. Alle Pflanzenteile wurden mit einer Schere klein zerschnitten.

2. Destillationsapparatur: Karlsruher Apparatur nach Stahl (1952, 1953).

3. Destillationsdauer: bei einer konstanten Destillationsgeschwindigkeit von 4 cm^3 je Minute schwankte die zur Erschöpfung der Droge nötige Dauer je nach Alter und Organ der Pflanze. Es erwies sich jedoch, daß die Ausbeute nicht mehr wesentlich verändert wurde, wenn jugendlich zartes Pflanzenmaterial 6 Stunden, ältere Pflanzenteile dagegen 9 Stunden destilliert wurden.

4. Kochsalzzusatz während der Destillation vermochte die Ausbeute an ätherischem Öl nicht zu erhöhen. Es wurde daher ohne Zusatz übergetrieben.

5. Zwar wurde durch Veränderung des Milieus sowohl nach der alkalischen wie nach der sauren Seite eine höhere Ausbeute erzielt, doch sollten die Bedingungen möglichst mild gehalten werden. Deshalb erfolgte die Destillation grundsätzlich aus neutralem Medium.

6. Zur Entfernung des Pentans kamen die Kölbchen mit dem darin gelösten Destillat in einem Sandbad von 60° in den Vakuumexsikkator. Dieser wurde bis

zu einem Druck von 50 mm Quecksilbersäule evakuiert und nach 25 Minuten das Kölbchen mit Inhalt gewogen. Die Prozedur wurde bis zur Gewichtskonstanz wiederholt.

p_H-*Messung:* Sie erfolgte beim Wasserdampfdestillat mit der Chinhydronelektrode (p_H-Ionenmeter L. Pusl, München). Man erzielt mit dieser Methode wegen des Rücklaufs in der STAHLschen Apparatur zwar keine absoluten, aber immerhin brauchbare relative Werte.

Säuregehalt: Die Säure des Destillates wurde mit 0,05 n KOH titriert und auf n KOH je mg Öl umgerechnet.

Estergehalt: Er wurde nach GUENTHER (1949) durch 1stündiges Verseifen des Öles am Rückfluß mit 0,5 n alkoholischer KOH und Zurücktitrieren mit 0,5 n HCl bestimmt.

Ketongehalt: Um zu ermitteln, welches Methylketon vorliegt, wurde es als 2,4-Dinitrophenylhydrazon nach JOHNSON (1951) aus dem Öl von Früchten und Blättern isoliert und sein Schmelzpunkt aus verschiedenen Lösungsmitteln mit dem aus der Literatur verglichen. Das entsprechende Hydrazon von Methylnonylketon Dragoco hatte denselben FP, der Mischschmelzpunkt damit zeigte keine Depression. Die erhaltenen quantitativen Werte lagen nur gering unter denen der folgenden Methode.

Diese hielt sich im wesentlichen an die Vorschriften von TROZZOLO und LIEBER (1950). Vor Durchführung der Oximierung wurde das ätherische Öl jedoch in neutralem Alkohol gelöst und mit 0,05 n KOH gegen Phenolphthalein neutralisiert. Der erhaltene Wert ergab gleichzeitig den Säuregehalt. Anschließend wurde der Estergehalt bestimmt und dann oximiert. Im Gegensatz zu TROZZOLO wurde allerdings am Schluß nicht die Hydroxylaminzahl, sondern der Prozentgehalt berechnet.

Chromatostrip-Methode: Zur Ermittlung, ob das Methylnonylketon bereits in der Pflanze vorliegt oder erst unter den Bedingungen der Wasserdampfdestillation entsteht, wurde das ätherische Öl aus grünen Früchten und Blättern durch Anstechen der Öldrüsen mit Glaskapillaren gewonnen und dieses auf Strips (GÄNSHIRT 1953, GOGRÖF 1955) aus 10,0 g Kieselsäure und 0,5 g Kartoffelstärke aufgetragen. Als Lösungsmittelgemisch dienten Essigester-Hexan und Pentan-Chloroform.

Um das Keton sichtbar zu machen, wurden verschiedene Methoden erprobt. Als beste und vor allem als am meisten selektive erwies sich in Anlehnung an die Salizylaldehyd-Reaktion von TÄUFEL-THALER (1932, 1937) ein Besprühen mit Salizylaldehyd in Spiritus und anschließend mit rauchender HCl, wodurch bei 100° im Trockenschrank sowohl die Kontrollproben mit Methylnonylketon Dragoco wie mit destilliertem und nativem ätherischen Öl rote Flecke bei einem R_f-Wert von etwa 0,7 ergaben. Dadurch ist die Identität des Methylnonylketons in den drei verschiedenen Proben gesichert.

II. Rutin und verwandte Stoffe

a) Rutin. Die Isolierung und Identifizierung des Rutins erfolgte im wesentlichen nach KLEIN (1932), doch wurde auch die Methode nach TORRES (1950), nach der mit 50%igem Alkohol extrahiert wird, als sehr brauchbar befunden.

Quantitative Rutinuntersuchungen: Für alle Untersuchungen wurden möglichst gleiche Bedingungen eingehalten. Bei Vergleichsbestimmungen wurden Ernte und Untersuchung immer zum selben Zeitpunkt durchgeführt. Die Ernte erfolgte jeweils zwischen 9 und 10 Uhr, die Verarbeitung sofort anschließend. Dies erscheint besonders nach den neuen Untersuchungen von ESDORN (1955) über tagesperiodische Schwankungen im Flavonolgehalt als sehr wesentlich.

Zur Messung des Rutingehaltes diente die Methode von HÖRHAMMER, HÄNSEL (1951).

Die ersten Bestimmungen konnten bei ausgewachsenen Pflanzen wie bei Keimlingen direkt aus dem Methanolextrakt durchgeführt werden. Da es aber bei etwa 1 Monat alten Keimpflanzen eine gewisse Zeitlang sowohl auf Verdünnung, wie auf Reagenszusatz hin zu Trübungen kommt, wurde bei sämtlichen Untersuchungen der methanolische Extrakt eingedampft, mit heißem Wasser aufgenommen, bis der Rückstand die Tauböck-Reaktion nicht mehr gab, und die wäßrige Lösung erneut vom Lösungsmittel befreit. Die mit einer bestimmten Menge Methanol aufgenommenen Flavonole konnten dann ohne Schwierigkeit durch die Farbtiefe ihres Metallkomplexes am Pulfrich-Photometer gemessen werden. Die eigene Eichkurve war mit der von HÖRHAMMER, HÄNSEL identisch. Der auf diese Weise gereinigte Extrakt zeigte im allgemeinen sogar leicht höhere Werte als die unbehandelten Proben.

Um Aglykone oder andere Flavonole bei diesem Arbeitsgang nicht auszuschalten, wurde das getrocknete Material mit Methanol-Essigester ausgezogen, und dieser Extrakt wie auch der zur quantitativen Bestimmung verwendete chromatographiert. In keinem Wachstumsstadium oder Organ wurden hierbei andere Flavonole, abgesehen von Spuren von Quercetin, entdeckt.

Vor der Bestimmung wurde das Untersuchungsmaterial bei 100° bis zur Konstanz getrocknet. Die Verluste durch Trocknen lagen innerhalb der Fehlergrenze.

Chromatographische Untersuchung: Diese hielt sich im wesentlichen an die von HÖRHAMMER, HÄNSEL und Mitarbeitern[1] ausgearbeiteten Methoden.

b) Anthocyan. *Extraktion:* Zerkleinerte Pflanzenteile bzw. die abgeschälte und zerkleinerte Rinde wurde in 1%iger HCl (oder in 0,2%iger Oxalsäurelösung nach KOZLOWSKI 1955) mazeriert.

Identifizierung: Da das Pflanzenmaterial nicht ausreichte, um das neben Rutin sehr wenig vorhandene Anthocyan zu isolieren und darnach zu identifizieren, wurden folgende Methoden zur Charakterisierung herangezogen:

1. Farbreaktionen (ROBINSON und ROBINSON 1931—1934).
2. Verteilung zwischen verschiedenen Lösungsmitteln (ROBINSON und ROBINSON 1934).
3. Papierchromatographie.

Tabelle 3. *R_f-Werte der Anthocyane und Anthocyanidine*

	R_f-Wert	Lösungsmittelgemisch	Farbe	
			sauer	ammoniakalisch
Anthocyan	0,16	Butanol 2n HCl 1:1	violett bis rosa	blaugrün
Nach Teilhydrolyse	0,30	Butanol 2n HCl 1:1	violett bis rosa	blaugrün
Anthocyanidin	0,69	Butanol 2n HCl 1:1	violett	blau
	0,5	Essigsäure/konz. HCl/Wasser 30:3:10	violett	blau
	0,69	m-Kresol/5,5n HCl/Essigsäure 1:1:1		

Die Reaktionen von 1. und 2. machten ein Pentose enthaltendes Diglykosid mit Cyanidin als Aglukon wahrscheinlich. Die Papierchromatographie erlaubte schließlich die genauere Feststellung:

Sie wurde nach der Methode von BATE-SMITH (1950, 1954) durchgeführt. Zur Verwendung kamen Extrakte bzw. Lösungen von

[1] Herrn Prof. Dr. HÖRHAMMER, der mir die Möglichkeit gab, mich in diese Methodik einzuarbeiten, sowie Herrn Doz. Dr. HÄNSEL, der mich dabei anleitete, möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank zum Ausdruck bringen.

a) aus *Ruta graveolens* isoliertem Anthocyan,
b) aus *Ruta graveolens* isoliertem Rutin, reduziert nach SHIBATA,
c) Rutin „Merck" reduziert nach SHIBATA,
sowie die Hydrolysenprodukte von a), b) und c).

Bei allen Untersuchungen wurde SS 2043b-Papier verwendet.

Die analogen R_f-Werte der Anthocyanidine von a, b und c weisen auch nach Vergleich mit der Tabelle von BATE-SMITH auf das Aglukon Cyanidin hin.

Die R_f-Werte des Anthocyans und der zu Vergleichszwecken herangezogenen reduzierten Flavonole lagen zwar dicht zusammen, doch war zur näheren Ermittlung des Zuckerrestes noch eine Bestimmung der Zucker notwendig.

Das Anthocyan wurde zunächst mittels einer Zellulosesäule gereinigt. Der salzsaure amylalkoholische Extrakt wurde dann mit Benzol behandelt, das Farbsalz dadurch in wäßrige Lösung übergeführt und anschließend papierchromatographisch auf Reinheit geprüft. Jetzt erst wurde entweder in salzsaurer (5%) oder in salpetersaurer (3%) Lösung hydrolysiert, mit $BaCO_3$ neutralisiert und anschließend auf SS 2043b aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 30 und 50 Stunden wurde mit Naphtoresorcin/Trichloressigsäure oder mit Anilinphthalat entwickelt (R-Werte siehe Tabelle 4).

Tabelle 4. *R_f-Werte der Anthocyanzucker*

	n-Butanol 4 Essigsäure 1 Wasser 5	Phenol 1 Wasser 1 (untere Phase)	Acetessigester 2 Pyridin 1 Wasser 2
Glucose .	0,17	0,31	0,19
Rhamnose	0,36	0,50	0,37

Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der R_f-Werte mit der Literatur, ferner durch reine Zucker- bzw. Hydrolysenprodukte des Rutins als Kontrollsubstanzen.

Leukoanthocyannachweis: Zur Anwendung gelangte hier die Methode nach BATE-SMITH (1954). Blindproben mit authentischem d,l-Katechin dienten zur Kontrolle.

Histologischer Anthocyannachweis: Hierzu wurden Längs- und Querschnitte gemacht, die unter dem Mikroskop, vor allem nach vorhergegangener Plasmolyse, eindeutige Resultate ergaben.

Bei Zugabe von verdünnter NaOH unter dem Mikroskop wurden die Anthocyanzellen zunächst blaugrün bis dunkelgrün und schließlich blieb nur noch das Gelb des Flavonols bestehen. Zufügen von verdünnter HCl bewirkte Reaktionsumkehr.

Nachweis der Lichtwirkung: Diese Versuche fanden stets im Freien statt. Die Abschirmung wurde bei Keimpflanzen mit rotgestrichenem Glas, bei den übrigen Pflanzen mit Topfscherben durchgeführt. Teilweiser Lichtschutz erfolgte durch Anbringen von 2—5 cm breiten Gummiringen an den Stengel.

Zur Messung der Belichtungszeit, die notwendig ist, um gerade noch Violettfärbung hervorzurufen, wurden etwa 3 Monate alte Pflanzen im Oktober an einen schattenfreien Ort gepflanzt und 3, 12 oder 20 Stunden dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt. Nach der angegebenen Belichtungszeit kamen die Pflanzen unter einen Topf.

c) Katechin und Gerbstoffe. *Katechinnachweis:* Hierbei wurde wie beim Leukoanthocyan verfahren.

Gerbstoffnachweis: Untersucht wurden ganze Keimpflanzen, junge und alte Blätter sowie Stengel und Wurzeln 3 Monate und 5 Jahre alter Pflanzen.

Die betreffenden Objekte wurden grob zerkleinert, in einem Porzellanmörser zu Brei zerstoßen und mit destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 60° 48 bzw. 60 Stunden lang ausgezogen. Mit dem braunen, konzentrierten und filtrierten Extrakt wurden die üblichen Untersuchungen durchgeführt.

Da aber die Gelatinefällung allgemein (DEKKER 1913, HERRMANN 1952) als sicherster Gerbstoffnachweis gilt, und nach GNAMM (1949) Stoffe, die diese Reaktion nicht geben, als Nichtgerbstoffe anzusehen sind, auch wenn sie sich bei anderen Reaktionen wie Gerbstoffe verhalten, wurde nur sie als Kriterium anerkannt.

Ergebnisse

Da jede Pflanze eine Vielzahl sekundärer Inhaltsstoffe hervorbringt, erscheint es zweckmäßig, gewisse Hauptlinien des Stoffwechsels zu verfolgen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde vor allem Wert darauf gelegt, die beiden pharmakognostisch wichtigen Stoffgruppen, das ätherische Öl und die Flavanderivate, zu bearbeiten.

I. Das ätherische Öl

1. Über die Entstehung des Methylketons

Wesentliches Gewicht bei den Untersuchungen über das ätherische Öl der Raute wurde, entsprechend dem Ziel der Arbeit, auf dessen Entstehung in der Keimpflanze gelegt. Dabei mußte die Beobachtung mit dem Samen beginnen, der zunächst der ausschließliche Nährstoffspender für den Embryo ist.

Seine Entwicklungsgeschichte ist bereits von SCHLOTTERBECK (1896) und POPOVICI (1926) beschrieben worden, die des Embryo von SOUÈGES (1925).

Der reife, bis etwa 3 mm lange Same ist dunkelbraun und nierenförmig, die Schale dicht mit Höckern besetzt. Sein 1000-Korngewicht betrug in dem vorliegenden Material 1,88 bis 2,0 g. Das Nährgewebe enthielt vor allem Fett (34—37,5%) und Eiweiß (20—22%), aber keine Stärke. Es besteht im wesentlichen aus dem Endosperm, in das der lange, gebogene Embryo eingebettet ist. Das Perisperm ist nur als unscheinbarer Rest vorhanden.

Untersuchung am ruhenden Samen. Nachdem DAKIN (1908) als erster die Vermutung äußerte, daß Methylketone in ätherischen Ölen aus Fettsäuren durch β-Oxydation entstanden sein könnten, vermochten vor allem CHIBNALL und PIPER (1934) durch Arbeiten an Pflanzen- und Insektenwachsen diese Vermutung zu bestätigen. Nach ihnen sind Ketone, sekundäre Alkohole und Paraffine Reduktionsprodukte der korrespondierenden (n + 1) Säure. Auch TÄUFEL, THALER und HOHNER (1937) sowie andere Autoren (ACKLIN 1929, STÄRKLE 1924, THALER u. SCHOTTMAYER u. a. 1949) konnten durch Untersuchungen mit *Penicillium*-Arten die Entstehung von Methylketonen aus Fettsäuren durch β-Oxydation wahrscheinlich machen. Aus den Veröffentlichungen von TÄUFEL, THALER und BAUER (1936) geht hervor, daß hinsichtlich des Vorkommens von Methylketonen in ätherischen Ölen einerseits und Fettsäuren der betreffenden fetten Öle andererseits keine Gesetzmäßigkeiten zu

erkennen sind. Als wichtige Stütze für die Hypothese einer Umwandlung von Fettsäuren in entsprechende Methylketone stellte TÄUFEL (1936) die Forderung, daß im Ausgangsstoff die entsprechende Fettsäure gefunden werden müsse. Seine Untersuchungen am ruhenden Samen der Weinraute (TÄUFEL u. THALER 1934, TÄUFEL, THALER u. BAUER 1936) zeigten jedoch, daß auf Grund der Kennzahlen der extrahierten Fettsäuren, Laurinsäure als Vorgänger des durchschnittlich zu 80% vorhandenen MNK nicht nachzuweisen ist. Eigene Untersuchungen am selben Objekt mit gleichen und anderen Methoden bestätigen diese Befunde. Während chromatographisch Laurinsäure nicht zu ermitteln war, deuten die R_f-Werte vor allem auf die Anwesenheit von C_{18}-Säuren hin. Von ihnen konnten dann auch Linolensäure, Linolsäure, Ölsäure und Stearinsäure als Derivate isoliert und durch Schmelzpunkt identifiziert werden. Die mit denen von TÄUFEL im wesentlichen übereinstimmenden Kennzahlen sind der folgenden Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5. *Ölgehalt und Kennzahlen der Samen von Ruta graveolens*

	Ölgehalt auf Trockengewicht %	RMZ	PZ	JZ	SZ	VZ	EZ
Ruhender Same	36,5 bis 37	0,5	0,3	175,5 bis 140,0	4—5	187	182 bis 183
9—12 Tage auf Keimbett (gering gekeimt)	34,7 bis 36,1	0,5	0,8 bis 2	140,7	8,6	198,6	190,0
15—17 Tage auf Keimbett (30—40% gekeimt)	28,7	0,0 bis 1,0	0,4 bis 0,75	137,5 bis 140,6			

Untersuchung am keimenden Samen. Die qualitative Zusammensetzung der Fettsäuren in den Glyceriden ruhender Samen kann sich im Verlaufe der Keimung ändern. Da das ätherische Öl zwar sehr früh, jedoch erst nach der Keimung entsteht, lag es nahe, auch die Zusammensetzung der Fette im keimenden Samen zu untersuchen. Wegen des nur beschränkt zur Verfügung stehenden Materials konnten entsprechende Hinweise nur aus den Kennzahlen und der Chromatographie der betreffenden Fette erhalten werden (s. Tabelle 5). Die Ergebnisse zeigten eindeutig, daß mit ins Gewicht fallenden Mengen von Laurinsäure oder noch kürzeren Fettsäuren auch hier nicht zu rechnen ist. Der Gehalt der wasserunlöslichen, wasserdampfflüchtigen Fettsäuren steigt während der Ankeimung nur unwesentlich an. Im weiteren Verlauf der Keimung sinkt er wieder ab. Chromatographisch waren Laurin- und niederere Fettsäuren nur in relativ verschwindenden Mengen nachzuweisen.

Abnahme des Fett- und anfängliche Zunahme des Zuckergehaltes, sowie das Auftreten neuer Zuckerarten lassen in Übereinstimmung mit anderen Autoren (Matthes 1927, Bernhard 1950, Bonner 1950, Daoud 1952, Crocker, Barton 1953, Duperon 1954, Täufel 1955 u.a.) darauf schließen, daß Fett teils verbrannt, teils zu Kohlenhydraten umgewandelt wird, was beides über den Citronensäurezyklus (Täufel, Pohloudek, Fabini 1954, 1955) durchaus verständlich wäre, da bei Fetten und Kohlenhydraten der Oxydations- bzw. Dissimilationsmechanismus im Citronensäurezyklus endet und sowohl der Weg, als auch die Bausteine dieser Nährstoffe selbst von da ab nicht mehr unterscheidbar sind (Bloch 1952). Ursprünglich vorhandene Zucker sind Saccharose und Raffinose, während der Keimung kommen Glucose und Fructose, sowie Spuren von Rhamnose hinzu.

Das Fett in grünen Pflanzenteilen. Aus der Tatsache, daß ätherisches Öl nicht nur im Keimling, sondern auch in der autotroph wachsenden Pflanze entsteht, ergab sich die Notwendigkeit, außer den Samen auch diese zu untersuchen. Entsprechend der Forderung Täufels mußte zunächst der Lipoidgehalt der Blätter, der Hauptbildungsstätte des ätherischen Öls, bestimmt werden. Er betrug 10%, bezogen auf Trockengewicht, und 0,7% ohne den äthanollöslichen Teil. Da die zur Verfügung stehende Menge sehr gering war, konnte das Fett nur chromatographisch untersucht werden. Die Zusammensetzung entsprach genau der des Samenfettes.

Die Ergebnisse von Täufel und Mitarbeitern, daß Laurinsäure nur in Mengen im Rautensamen vorkommt, die nicht ins Gewicht fallen, lassen sich, wie oben gezeigt wurde, nicht nur für den ruhenden, sondern auch für den keimenden Samen und die grünen Teile der Pflanze bestätigen.

Seine These jedoch, daß damit eine wesentliche Stütze für die Entstehung des MNK über die β-Oxydation entfällt, kann heute nicht mehr im gleichen Maße aufrechterhalten werden.

Beim Abbau von Fettsäuren wurden bis jetzt keine Zwischenprodukte isoliert (Lynen, Reichert 1951, Flaschenträger 1955, Green 1955). Es muß daher angenommen werden, daß die β-Oxydation der Coenzym-A-Fettsäuren normalerweise nicht vor dem Endglied aufhört. Nun sind jedoch für diese Abbaukette verschiedene Fermentsätze notwendig, die jeweils nur auf ganz bestimmte Kettenlängen wirken (Green 1953, Hoffmann-Ostenhof 1954). Im Lichte der Massenwirkungstheorie der adaptiven Enzymbildung[1] ist es nach dem Yudkin-Schema unwahrscheinlich, daß der Fermentgehalt begrenzend wirkt (Lang 1953). Hierfür liegen auch — mindestens für den Bereich der biologischen Oxydation — keine Hinweise vor (Lang 1953). Doch ist es durchaus vorstellbar,

[1] Mandelstam, Yudkin und Mandelstam 1951; Hinshelwood 1953.

daß beim Wechsel des Ferments unter bestimmten Umständen und mit Hilfe eines geänderten Permeationsvermögens gewisse Kettenlängen von β-Ketonsäuren sich durch Abdiffundieren dem Abbaubereich der weiteren β-Oxydation entziehen, zumal der Fettumsatz im wesentlichen an strukturierte Elemente gebunden ist (HOLZER 1953).

Die Tatsachen, die nun im vorliegenden Fall für eine Entstehung des Ketons aus den Produkten der β-Oxydation sprechen, sind:

1. Entstehung von Methylketonen beim Fettabbau durch bestimmte Pilze.

2. Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 C nehmen in gewisser Hinsicht eine Sonderstellung ein (GREEN 1953, POLONOWSKI 1951, ZIEGLER 1954, WEITZEL u. a. 1955).

3. In der Raute kommen in geringeren Mengen auch niedere Methylketone vor (PFAU 1932), was an die „Streuung" beim Aufbau der Fettsäuren in der Pflanze erinnert (HILDITCH 1949).

4. Nach TSCHERNUCHIN (1929) werden bei Coriander zunächst Carboxylgruppen synthetisiert, die dann zu Aldehyden oder Ketonen reduziert werden.

5. Durch Reduktion am β-C-Atom können die betreffenden kürzer gewordenen Säuren erhalten bleiben, wodurch die leichte Zunahme derselben kurz nach der Ankeimung verständlich wäre. Im weiteren Verlauf werden sie dann abgebaut (POLONOWSKI 1951).

In Anbetracht des Vorkommens von MNK in den nur wenig Fett enthaltenden grünen Organen, sowie der Koppelung von Ölsynthese und Wachstum, wäre unter Umständen seine Entstehung durch die Umkehr der β-Oxydation, wie sie für den Fettsäureaufbau angenommen werden muß (BERNHARD 1950, ECKEY 1954), zu diskutieren, zumal die Bildung gewisser Ketonkörper auf diesem Wege bereits nachgewiesen wurde (BERNHARD 1950, BLOCH 1952, GREEN 1953, AVIGNAN u. a. 1954). Diese Vorstellung wird ferner sehr stark dadurch gestützt, daß PFAU (1932) in der Raute ein Methyloctylketon finden konnte, was ihn veranlaßt, den normalen Fettsäureabbau als Ausgangspunkt der Ketonsynthese zu bezweifeln.

Neuere Überlegungen, die den Citronensäurezyklus als „metabolic pool" für viele Aufbaueinheiten ansehen (ZIEGLER 1954, LIPMANN 1955) und die Wahrscheinlichkeit, daß nicht nur Fettsäuren, sondern auch Kohlenhydrate (ZIEGLER 1954, FLASCHENTRÄGER 1955) einschließlich Stärke (PAECH 1950, ZELLER 1936) so wie Eiweiß (LIPMANN 1955, VIRTANEN 1955) durch Kondensation von „aktivierter Essigsäure" bzw. von Ketonsäuren entstehen, würden alle Tatsachen einschließlich derjenigen, die bei der β-Oxydation angeführt wurden, erklären. Allerdings wäre die Entstehung der Methylketone dann weniger unmittelbar aus dem Fettstoffwechsel, als vielmehr aus dem allgemeinen Stoffwechsel heraus zu verstehen.

2. Die Sekretbehälter

a) Entwicklung. Zur Klärung der Frage, in welchem Entwicklungsstadium der Pflanze die Bildung des ätherischen Öles einsetzt, genügen quantitative Bestimmungen allein nicht, zumal bei der in diesem Zustand sehr geringen Ausbeute eindeutige Trennung und Identifizierung der Inhaltsstoffe nur mit Einwagen möglich sind, die sich versuchstechnisch — auch wegen der starken Verdunstung — kaum bewältigen lassen.

So ergibt sich die Notwendigkeit, die quantitativen Untersuchungen durch anatomische und physiologische zu ergänzen, wofür die Keimblätter besonders geeignet sind. Sie haben im Gegensatz zu den Folgeblättern leicht abmeßbare Formen, sind ganzrandig, gut zu übersehen und lassen sich vor allem in einer verhältnismäßig kurzen Zeitspanne während ihrer ganzen Entwicklung verfolgen.

Die im Nährgewebe eingebetteten Keimblätter sind mit Nährstoffen vollgepfropft. Die ersten Beobachtungen wurden daher am Mikrotomschnitt gemacht. Im ruhenden Samen sind keine Anzeichen für die Bildung von Sekretzellen vorhanden. Im leicht angekeimten Samen mit einer Radicula von etwa 2 mm Länge konnten bereits fertig ausgebildete Sekretzellen festgestellt werden, die im fortgeschrittenen Stadium deutlich schizogen entstandene Interzellularräume bilden. Die meisten Drüsen, vor allem die in der Blattmitte gelegenen, waren allerdings erst in der Anlage oder in verschiedenen frühen Entwicklungsstadien zu sehen.

Die Mutterzelle der Sekretbehälter läßt sich häufig nicht eindeutig feststellen, da sie sich sehr rasch weiter differenziert und größenmäßig nur wenig von den umgebenden Zellen verschieden ist. Sie erweist sich von vornherein als Idioblast, ist dicht mit Plasma erfüllt und grundsätzlich in der subepidermalen Schicht lokalisiert. In keinem Falle wurden in ihr selbst oder in den von ihr abstammenden Zellen Chlorophyllkörner beobachtet. Der aus der Mutterzelle sich entwickelnde Komplex von 20 und mehr Zellen hebt sich optisch deutlich von seiner Umgebung ab, was seine Beobachtung auch im Mikrotomschnitt mit fixiertem Material sehr erleichtert.

Die Bildung des schizogen entstandenen Interzellularraums, die darin abgeschiedenen Öltröpfchen und schließlich die lysigene Erweiterung des Ölraumes ließ sich bei den Keimpflanzen in der gleichen Weise verfolgen, wie sie bereits Brandt (1915) an jugendlichen Teilen der älteren Pflanze beschrieben hat. Im wesentlichen zu den gleichen Ergebnissen kommt auch Sieck (1895). Die Feststellungen von Gilg und Schürhoff (1929), die von einer lysigenen Entstehung der Ölbehälter sprechen, konnten nicht bestätigt werden.

Durch Abzählen und Messen der gebildeten Sekretdrüsen mußte sich nun die laufende Ölproduktion überblicken lassen (SCHRATZ, SPANNING 1944, WEILING 1950, KÖLLE 1952, GRAHLE 1955). Hierbei nehmen die randständigen Drüsen eine Sonderstellung ein, da sie am schnellsten gebildet und ausdifferenziert werden und, im Gegensatz zu den Behältern in der Blattmitte, leicht zu zählen und zu messen sind. Sie werden daher in der folgenden Tabelle besonders behandelt.

Die Zusammenstellung in Tabelle 6 gibt die Durchschnittswerte von über 60 untersuchten Keimblattpaaren verschiedenen Entwicklungsalters und von etwa 2500 gemessenen Sekretbehältern wieder. Sie zeigt im ersten Teil den Entwicklungszustand der Keimpflanze, wobei die Keimblätter 1. von der Samenschale umschlossen, 2. bereits zur Hälfte herausgewachsen und 3. völlig frei von ihr sind.

Der zweite Teil setzt Zahl und Größe der Sekretbehälter mit der Allgemeinentwicklung in Beziehung.

Tabelle 6. *Drüsenzahl und -größe in Keimblättern*

Keimblatt	Wurzel und Hypokotyl mm	Keimblattspreite Länge mm	Keimblattspreite Breite mm	Primäre Blattspreite Länge mm	Drüsenzahl Randdrüsen	Drüsenzahl Innendrüsen	Drüsendurchmesser Rand µ	Drüsendurchmesser Innen µ
Völlig umschlossen	2—5	1,7—2,3	0,75—0,9	Keimblätter vollgepfropft mit Nährstoffen, Drüsen nur vereinzelt zu sehen				
	6—10	2,3—2,7	0,87—0,94		46	32	25	25
	12—16	2,5—3,2	0,82—1,0		56	35	35	31
Halb aus Samenschale	11—23	3,2—4,6	0,93—1,2	0,3	58,5	100	38	31
Völlig aus Samenschale	20—30	3,4—4,8	1,0 —1,5	0,5	65	110	41	31,5
	35—47	4,2—5,9	1,2 —1,7	0,7	67	112	41	31
	49—60	4,6—5,9	1,2 —2,0	0,8	68	123	41	31
		4,8	2,0	1,3	68	143	41,5	33
		4,8	2,1	1,5	68	145	41,5	33

Die geringe Zunahme der Zahl der Innendrüsen am Ende der Entwicklung ist unter Umständen darauf zurückzuführen, daß einige Drüsen zwar schon vorher vorhanden sind, jedoch jetzt erst sichtbar werden.

Das Ergebnis aus obiger Tabelle kann wie folgt zusammengefaßt werden: Die Anlage der Drüsen erfolgt in den Keimpflanzen mit beginnendem Wachstum. Ihre Entwicklung geht im wesentlichen mit diesem parallel.

Gleichlaufende Untersuchungen an etiolierten Keimlingen zeigten, daß das Etiolement die Keimblattgröße etwas herabsetzt und entsprechend damit die Zahl der Drüsen im gleichen Verhältnis reduziert.

Da trotzdem die Zahl der randständigen Sekretbehälter fast völlig gleich bleibt, muß ein erblich bedingtes Muster bei ihrer Anlage angenommen werden.

In Ausbildung begriffene Drüsenanlagen findet man nur in frühen Stadien der Organbildung. Die Zahl der Drüsen nimmt dann nicht mehr zu. Da auch die Größe der Behälter nur bis zu einem gewissen Maße zunimmt, kann man — zusammen mit den quantitativen Untersuchungen — den Schluß ziehen, daß die Ölbildung im wesentlichen mit der Beendigung des Wachstumsprozesses abgeschlossen ist.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt KLUG (1926) bei Compositen und Labiaten.

Die hier beim Keimling geschilderten Verhältnisse wiederholen sich entsprechend in den Organen der heranwachsenden Pflanze.

Die Anatomie und den Entleerungsapparat der inneren Drüsen von Ruta graveolens und anderen Rutaceen schildert eingehend HABERLANDT (1898).

b) Zytologie. Bei sezernierenden Zellen wird immer wieder beobachtet, daß ihre Zellkerne größer sind als die der sie umgebenden gleichaltrigen Zellen. Es lag daher nahe, auch im vorliegenden Falle zu untersuchen, worauf die Kernvergrößerung zurückzuführen ist. Ähnliche Untersuchungen an nicht weiter genannten Objekten führte bereits DEUFEL (1954) durch. Er kam zu dem Schluß, daß bei stammesgeschichtlich alten Pflanzen, sowie bei Schleim und Zucker ausscheidenden Zellen die Kerne wohl im wesentlichen durch Zunahme der Karyolymphe vergrößert werden, während sonst — und zwar zum überwiegenden Teil — Volumenvergrößerung durch Endomitose erfolgt.

Die Untersuchung wurde vor allem an Sekretbehältern junger Primärblätter durchgeführt. Sie wurden nach CARNOY fixiert und nach GEITLER mit Karminessigsäure gefärbt. In den Quetschpräparaten sind die Sekretzellen ohne weiteres zu erkennen. Ihr Plasma ist etwas stärker gefärbt, ebenfalls der Nucleolus, der dazu noch stark vergrößert erscheint. Die Zellen sind sehr dünnwandig und vollkommen mit Plasma gefüllt.

Gleichzeitig mit der Zellvergrößerung und Plasmavermehrung nimmt auch der Zellkern an Volumen zu. Dies ist, wie die Strukturanalyse zeigt, nicht auf eine Zunahme der Karyolymphe, sondern auf eine Vermehrung des chromatischen Materials durch Endomitose zurückzuführen, was aus dem Verhalten der Chromozentren deutlich hervorgeht. In noch diploiden Kernen findet man rund 15—20 Chromozentren. Die Endomitose beginnt mit einer Auflockerung des Kerngerüstes und Vergrößerung des Kerns, während gleichzeitig die Chromozentren „zerstäuben" und nur noch zum Teil mehr oder weniger deutlich sichtbar sind (Endoprophase). Die Chromozentren werden bei der weiteren Kerndifferenzierung stärker

sichtbar (Endometaphase) und teilen sich je einmal während der Endoanaphase. Im vollständig ausdifferenzierten Kern ist die Chromozentrenzahl etwa verdoppelt (zwischen 30 und 40). Das Plasma ist jetzt nicht mehr so stark gefärbt. In diesem Zeitpunkt setzt die Sekretbildung ein. Das Kerngerüst in dem nun tetraploiden Kern ist genau so dicht gelagert wie im diploiden. Die einzelnen Fäden des Gerüsts sind sehr schwach gefärbt und verhältnismäßig wenig sichtbar.

Nach der Endomitose erfolgt in den Sekretzellen keine weitere Zellteilung mehr.

Während der Ölbildung tritt Kerndegeneration ein durch Verklumpung des chromatischen Materials. Gleichzeitig nimmt das Plasma ab, während die schon vorher aufgetretenen farblosen Stellen in dem schwach gefärbten Plasma sich vermehren bzw. verschmelzen. Schließlich löst sich die ganze Zelle auf.

Da die oben geschilderte Zunahme der chromatischen Substanz allein kein verläßliches Kriterium für die Endomitose darstellt (TSCHERMAK-WOESS u. HASITSCHKA 1953), wurden neben der Strukturanalyse noch Volumenbestimmungen durchgeführt. Die Feststellung des rhythmischen Kernwachstums (Tabelle 2) bestätigte die Annahme einer endomitotischen Polyploidisierung.

Da nur wenige Stadien ohne Chromozentren, also während der Endomitose, zu finden sind, ist anzunehmen, daß diese sehr rasch abläuft.

Auch die Teilung der Zellen des jungen Sekretbehälters muß sehr rasch vor sich gehen, da Mitosestadien kaum aufgefunden werden konnten. Dafür sprechen auch die rasche Ausdifferenzierung und das baldige Erreichen der endgültigen Größe der Sekretbehälter.

Unter der Annahme, daß die größte Breite auch die größte Tiefe ist, läßt sich das Volumen des Ellipsoids berechnen (MÖRIKE 1953).

Die 4n-Kerne sind stärker abgerundet als die 2n-Kerne. Letztere liegen meist mehr am Rande.

3. Quantitative Untersuchungen an der Keimpflanze

Die ersten orientierenden Versuche zeigten, daß auch die Samen selbst wasserdampfflüchtige Stoffe enthalten, die sich in Pentan lösen. Ihre Menge nimmt bis zum Erscheinen der Radicula etwas ab, in der weiteren Entwicklung wieder zu. Ähnlich verhält sich der p_H-Wert des Wasserdampfdestillates, der bis zu diesem Moment von etwa 8,1 bis auf 10,4 ansteigt und dann wieder auf durchschnittlich 6,0 absinkt.

Untersuchungen mit dem Ziel, die erste Bildung des Methylnonylketons festzustellen, führten bei der Analyse des Wasserdampfdestillates zu keinem eindeutigen Ergebnis. Die Salizylaldehyd-Reaktion (TÄUFEL u. THALER 1932, 1937) war zwar positiv, doch kann dies bereits durch Wasserdampfdestillation einfacher Fettsäuren erreicht werden (TÄUFEL,

Thaler u. Martinez 1933). Es wurde daher auch von einer Isolierung desselben aus dem an sich schon sehr geringen Destillat abgesehen. Dieses weist jedoch vom Beginn der Keimung an den typischen Geruch des Ketons auf.

In Tabelle 7 sind die Mittelwerte verschiedener Bestimmungen an normalen und an im Rotfenster gezogenen Keimlingen angegeben. Die Zahl der Tage zeigt die Zeitdauer an, die seit dem Ansetzen des Versuches verstrichen ist. Da das Auskeimen etwa 7 Tage nach diesem Zeitpunkt erfolgt, wäre das Alter des Pflänzchens somit jeweils 7 Tage jünger.

Tabelle 7. *Gehalt an ätherischem Öl in normalen und etiolierten Keimlingen*

	Zahl der Tage								
	13	18	22	28	34	44	55	62	69
Etioliert γ je Keimling .	2,3	2,8	3,5	4,2	6,5	8,3	9,4	9,6	12,3
Gewichtsprozent . . . a)	0,018	0,017	0,018	0,019	0,024	0,028	0,030	0,028	0,030
Gewichtsprozent . . . b)	0,18	0,17	0,19	0,19	0,32	0,33	0,3	0,32	0,35
Normal γ je Keimling .	3,6	5,3	7,9	10,2	24,0	62,3	105,5	193,3	226,5
Gewichtsprozent . . . a)	0,030	0,031	0,033	0,034	0,036	0,036	0,032	0,034	0,036
Gewichtsprozent . . . b)	0,18	0,17	0,30	0,30	0,30	0,30	0,26	0,32	0,29

a) Bezogen auf Frischgewicht; b) bezogen auf Trockengewicht.

Die Zusammenstellung gibt durch den Wechsel des Bezugssystems verschiedene aufschlußreiche Hinweise auf die Synthese des ätherischen Öles:

1. Der Anstieg des Pflanzengewichtes und, damit verbunden, des Gehaltes an ätherischem Öl ist durch die Lichtfilterung mittels des Rotfensters wesentlich verlangsamt.

2. Bezogen auf den einzelnen normalen Keimling, steigt während der Versuchszeit der Gehalt an ätherischem Öl nur etwas stärker ($1 \rightarrow 63$) als sein Frischgewicht ($1 \rightarrow 48$) an. Dagegen ist der Anstieg beim etiolierten Keimling ($1 \rightarrow 5{,}3$) wesentlich stärker, als seinem Zuwachs ($1 \rightarrow 1{,}8$) entspricht.

Dies rührt daher, daß im Gegensatz zur normalen Pflanze das rasche anfängliche Wachstum während des Etiolements im wesentlichen auf Wassereinlagerung beruht.

Tabelle 8. *Gewichtszunahme von je 1000 normalen bzw. etiolierten Keimlingen*

	Tag					
	13	15	20	27	34	55
Frischgewicht normal . .	11,5	13,4	17,2	33,6	54,2	312,0
Frischgewicht etioliert. .	14,2	16,6	18,7	19,7	23,6	28,0
Trockengewicht normal .	2,2	2,3	2,6	4,9	8,2	46,0
Trockengewicht etioliert .	1,4	1,6	1,8	1,9	2,1	2,4

Vergleicht man die Frisch- und Trockengewichtszunahme der wachsenden Pflanze mit der gleichzeitig produzierten Menge an ätherischem Öl, so ergibt sich die Tatsache, daß während des Zellstreckungswachstums verhältnismäßig wenig ätherisches Öl gebildet wird. Die niedere Anfangsquote an ätherischem Öl im Gegensatz zum hohen Frischgewicht der etiolierten Pflanze verschiebt also die Relation zwischen Ölproduktion und Wachstum und erklärt so die oben angegebenen Anstiegswerte.

3. Die im Normalfall fast sprunghafte Steigerung der Synthese des ätherischen Öles etwa vom 28. Tag an entspricht auch der Zunahme an Gewicht durch die Entwicklung der Folgeblätter. Dieser Einschnitt entfällt durch das Etiolieren.

4. Das Trockengewicht des etiolierten Keimlings beträgt in fast allen untersuchten Stadien im Durchschnitt etwa 9,5% des Frischgewichtes, beim normalen Keimling durchschnittlich etwa 16%. Bezogen auf das Trockengewicht, nimmt der Prozentgehalt des ätherischen Öles während des Etiolements etwas langsamer zu als unter Lichteinfluß, übertrifft ihn aber dann um ein Geringes.

5. Demgegenüber bleibt der Ölgehalt in bezug auf das Frischgewicht im Lichtkeimling nahezu konstant, während er beim etiolierten langsam zunimmt, jedoch etwas unter dem normalen Stand bleibt. Dies könnte vor allem am Anfang aus dem durch verringerten Lichtzutritt bedingten stärkeren Streckungswachstum herrühren (s. Punkt 2).

Die Tabelle zeigt, daß durch den veränderten Stoffwechsel während des Etiolements im Verhältnis zur Trockensubstanz etwa gleich viel ätherisches Öl produziert wird wie unter Normalbedingungen.

Ferner ist festzustellen, daß im Gegensatz zum Rutin das ätherische Öl auch bei längerem Etiolement weiter zunimmt.

4. Quantitative Untersuchungen an Blättern und Früchten

Während viele Autoren, u. a. auch TORRES (1950) mit der Dichromatmethode, bezogen auf das Trockengewicht, ein Ansteigen des Gehaltes an ätherischem Öl bis zur Blüte und darauffolgendes geringes Absinken feststellen, haben die eigenen Untersuchungen gezeigt, daß wegen des verhältnismäßig hohen Gehaltes an ätherischem Öl in heranreifenden Früchten die Pflanze in diesem Stadium eine besonders hohe Gesamtausbeute ergeben kann:

Gesamtpflanze ohne Wurzeln bezogen auf Frischgewicht

1. kurz vor dem Aufblühen 0,07%
2. in Blüte 0,096%
3. mit grünen Früchten . . . . . 0,12%.

Die detaillierte Untersuchung zeigt jedoch, daß Blätter und Blattstiele allein im zweiten Fall durchschnittlich 0,09%, im dritten jedoch

nur 0,07% enthalten, während die Früchte allein hier 0,27% aufweisen. Daraus geht hervor, daß für stark beblätterte Sprosse die Feststellung von TORRES (1950) durchaus gilt, daß man aber bei pflanzenphysiologischen Arbeiten die einzelnen Organe untersuchen muß, um eindeutige Resultate zu erhalten.

Die Mittelwerte der ätherischen Ölausbeute aus den Blättern einer fünfjährigen Staude zeigen, daß der Gehalt an ätherischem Öl bis zur vollen Entwicklung der Blätter ansteigt und dann wieder abfällt:

dunkelgrün hart (alt)	0,135%
mittlere Blätter	0,177%
hellgrüne, ganz junge Blätter	0,159%.

Auch enthalten gerade ausdifferenzierte Blätter, bezogen auf das Trockengewicht, mehr Öl (0,55%) als ältere (0,48%). Für beide Feststellungen können im wesentlichen 3 Gründe maßgebend sein:

1. Das ätherische Öl verdunstet.
2. Das Blattmaterial nimmt ohne Neubildung von ätherischem Öl weiter zu.
3. Das ätherische Öl wird wieder in den Stoffwechsel einbezogen.

Die 3. Deutung wird durch die Untersuchungen an den Keimpflanzen als wesentlicher Gesichtspunkt unwahrscheinlich. Für die erste Erklärung spricht, daß Sonnenblätter weniger Ölgehalt (0,176%) aufweisen als Schattenblätter (0,197%). Der besonders starke Geruch an heißen Tagen unterstreicht diese Feststellung noch. Um einen Vergleich mit den anders lautenden Ergebnissen von LUBIMENKO zu haben, müßten die genauen Daten dieser Arbeit erreichbar sein (ESDORN 1949).

Auch bei jüngeren (6 Monate alten) Pflanzen liegen die Verhältnisse wie bereits angeführt:

Blätter dunkelgrün, alt	0,117%
Blätter mittleres Stadium	0,127%
Blätter hellgrün, kaum entfaltet	0,099%.

Bei 3 Monate alten Weinrauten liegt der ätherische Ölgehalt um 0,052%, bei 2 Monate alten um 0,049%, auch hier wiederum ein Hinweis auf die sich steigernde Ölproduktion während des Wachstums.

Besonderen Erfolg versprachen nun Untersuchungen an Früchten, bei denen sich in kurzer Zeit an einheitlichem Material Ölsynthese und Wachstum verfolgen lassen. Der verhältnismäßig hohe Ölgehalt ließ auch eine eindeutige Bestimmung des Methylketons durch Oximierung zu, da es nach dieser Methode bei den Früchten zu etwa 90% vorliegt, während es in den Blättern oft 20% nicht übersteigt. Letzteres steht zwar im Widerspruch mit der Literatur über das ätherische Rautenöl, doch handelt es sich bei den dort zugrunde liegenden Untersuchungen fast ausschließlich um Öl, das von Rauten aus Mittelmeerländern stammt,

während die vorliegenden Resultate mit Pflanzen aus dem botanischen Garten der Technischen Hochschule Karlsruhe in dem sehr regenreichen Sommer 1954 erhalten wurden. Es könnte hier der interessante Schluß gezogen werden, daß bei der Fruchtentwicklung anscheinend auch dann optimale Bedingungen herrschen, wenn diese in der übrigen Pflanze nicht ganz erreicht werden können. Sicherer erscheint die Annahme des Fehlens eines Enzyms, da der ätherische Ölgehalt durchaus im üblichen Rahmen liegt. Die quantitative Isolierung des Ketons bestätigte diese Befunde. Es wurde ferner dabei sichergestellt, daß es sich bei dem Keton um das n-Methylnonylketon handelt.

In Tabelle 9 sind neben dem Gehalt an ätherischem Öl auch Angaben über dessen Zusammensetzung enthalten.

Tabelle 9. *Untersuchung des ätherischen Öles an Früchten verschiedenen Entwicklungsalters*

	100 Stück Gewicht g	Öl je Stück mg	Öl im Frisch-Gewicht in %	Öl im Trocken-Gewicht in %	Säure ‰	Ester ‰	Keton %	p ± des wäßrigen Destillates
Fruchtknoten ohne Blütenteile	2,7	0,08	0,31	2,12	0,2	0,53	43,6	3,3
Früchte mittl. Größe und Reife	4,7	0,24	0,5	2,5	0,05	0,25	88,2	4,5
Früchte ausgewachsen grün	21,9	1,2	0,57	2,5	0,024	0,18	93,5	5,4
Früchte zum Teil braun	15,2	1,0	0,66	2,6	0,05	0,17	93,6	6,15
Früchte braun . . .	11,4	0,75	0,65		0,057	0,22	80,0	6,5
Früchte teilweise geplatzt	6,8	0,96	1,4	2,2	0,062	0,19	83,2	6,3

Aus ihr geht weiter hervor, daß die letzte Reihe etwas von den vorhergehenden abweicht. Dies ist wohl einmal darauf zurückzuführen, daß ein Teil der Samen schon ausgefallen sein kann, was zu Verschiebungen in den Gewichtsrelationen führen würde. Zum anderen aber konnte bereits eingangs festgestellt werden, daß reife Samen selbst wasserdampfflüchtige Stoffe enthalten, was sowohl das Wiederansteigen der Ausbeute wie das Absinken des Ketongehaltes erklärt. Dafür spricht auch die Veränderung des auf das Trockengewicht bezogenen Ölgehaltes.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Das Gewicht der Früchte steigt zunächst an, um dann beim Austrocknen der Fruchtkapsel wieder abzunehmen. Es sei hier noch auf den Prozentgehalt der Trockensubstanz am Frischgewicht hingewiesen. Er steigt von 17,2% beim Fruchtknoten über 18,2—24,5 — 31,1—42,6 bis 70,2% an.

2. Entsprechend dem Frischgewicht verhält sich auch die Ausbeute an ätherischem Öl, bezogen auf die einzelne Frucht. Die Ausnahme in der letzten Reihe ist bereits besprochen. Der Verlust an Öl dürfte auf Verdunsten desselben zurückzuführen sein.

3. Der Prozentgehalt an ätherischem Öl, bezogen auf das Frischgewicht, steigt etwas länger an als der Ölgehalt je Frucht, was durch den Gewichtsverlust der Fruchtkapsel durch Trocknung bei der Reifung verständlich wird. Bezogen auf das Trockengewicht, unterliegt der ätherische Ölgehalt erwartungsgemäß nur geringen Veränderungen, die durch obige Gründe hinreichend erklärt sind.

4. Der Ketongehalt nimmt zunächst zu. Seine Abnahme dürfte, wie schon angeführt, aus einer Vermehrung der wasserdampfflüchtigen Stoffe durch solche aus den reifen Samen herrühren. Voraussetzung dafür ist, daß das ätherische Öl in den Drüsen weder stärker abdunstet noch in den Stoffwechsel mit einbezogen werden kann. Es muß aber auch Reduktion des Ketons zum Alkohol in Betracht gezogen werden (Neuberg 1920, Tschernuchin (1929), was jedoch infolge des nur in beschränktem Umfang zur Verfügung stehenden Materials nicht untersucht werden konnte.

5. Die wasserunlöslichen Säuren nehmen zunächst ab, dann wieder zu.

6. Der Gehalt an wasserlöslichen Säuren sinkt während des Reifeprozesses.

7. Der Estergehalt ist im Fruchtknoten am höchsten und sinkt dann rasch ab, um im Verlaufe der Reifung konstant zu bleiben.

Zur Feststellung, inwieweit das Keton schon im genuinen Öl vorhanden ist oder erst bei der Wasserdampfdestillation entsteht, wurde das Öl direkt aus der Pflanze auf ein Chromatostrip aufgetragen und auf Gehalt an MNK geprüft. Es war sowohl in den Früchten als auch in geringerer Menge in den Blättern bereits enthalten, was sich auch ohne Analyse am intensiven Geruch feststellen läßt.

II. Rutin und verwandte Stoffe

Nach der folgenden Reduktionsreihe

Flavonol → Anthocyanidin → Katechin,

aus der allerdings an dieser Stelle keine biologischen Folgerungen gezogen werden sollen, lag es nahe, neben dem Flavonol auf Anthocyanidine und Katechine bzw. allgemein auf Gerbstoffe zu prüfen.

In der Literatur wird neben Rutin lediglich dessen Aglykon Quercetin als Spaltprodukt angegeben.

Anthocyan wurde weder in den speziellen Arbeiten über Ruta noch in allgemeinen Anthocyanübersichten (Gertz 1906, Lippmaa 1928,

KARRER 1932, ROBINSON 1931—1938, BLANK 1947) aufgeführt. Lediglich HEEGER u. BRÜCKNER (1950) geben an, daß der Stengel violett gefärbt sein kann.

Gerbstoffe nennen lediglich HABERLANDT (1898), BERGER (1954) und HOPPE (1947), während die meisten der bereits genannten Autoren darüber nichts erwähnen.

1. Flavonole

a) Identifizierung. Neben der Isolierung des Rutins und seiner Identifizierung durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt mit Rein-Rutin „Merck" und durch Nachweis seiner Hydrolysenprodukte wurden die Untersuchungen an sämtlichen Pflanzenteilen und in allen Altersstufen papierchromatographisch verfolgt. Außer Rutin und unbedeutenden Mengen Quercetin war niemals ein anderes Flavonol nachzuweisen.

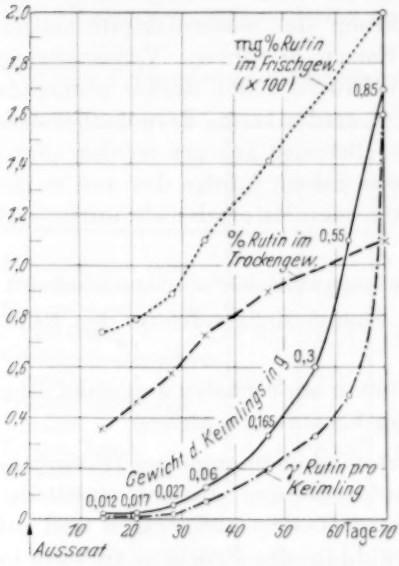


Abb. 1. Rutingehalt bei Keimpflanzen

b) Verteilung in verschiedenen Organen. Der höchste Rutingehalt wurde in Blütenblättern mit 1%, bezogen auf Frischgewicht, festgestellt. Es muß hier jedoch hinzugefügt werden, daß die Farbgebung im wesentlichen durch Karotinoide erfolgt, von welchen nach der Methode von SEYBOLD (1954) sowohl chymochrome als auch plasmochrome nachgewiesen wurden.

Die Blätter enthalten um 0,5% Rutin. Über grüne und nichtgrüne Stengel sinkt dieser Wert schließlich bei den Wurzeln auf weniger als 0,01%. Dabei fällt auf, daß besonders bei älteren Stengeln das Flavonol sich mehr und mehr in der Peripherie anhäuft. Wie auch schon PARIS (1936) feststellte, sind beblätterte Zweige reicher an Rutin als blühende oder fruchttragende Zweigspitzen. Bei den oben angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte, welche zu verschiedenen Zeiten und unter verschiedenen Bedingungen starken Schwankungen unterliegen.

c) Beginn der Rutinbildung. Der ruhende Same enthält kein Flavonol. Kurz nach Keimungsbeginn kann sowohl bei etiolierten wie bei Lichtkeimlingen Rutin nachgewiesen werden.

d) Verhalten während der Vegetationsperiode. Der Anstieg des Rutingehaltes bei Keimlingen (s. Abb. 1) läßt vermuten, daß die wachsenden

Organe als Beiprodukt dieses Flavonol bilden. Untersuchungen an älteren Pflanzen, vor allem aber an etiolierten Keimlingen, müßten dann zeigen, ob eine direkte Verbindung zwischen Rutinsynthese und Wachstum besteht.

Jüngere Blätter wiesen einen höheren Flavonolgehalt auf als alte, völlig ausgewachsene, unabhängig davon, ob sie an einer relativ jungen oder alten Pflanze wuchsen. Selbst herbstgelbe Blätter zeigten einen geringeren Rutingehalt als entsprechende grüne Blätter (Tabelle 10).

Tabelle 10. *Rutingehalt von Blättern verschiedenen Alters*

Alter der Pflanze	Entwicklungszustand der Blätter	Rutin im Frischgewicht %	Rutin im Trockengewicht %
5 Jahre	alte Blätter	0,46	1,62
	junge Blätter	0,83	3,23
6 Monate	alte Blätter	0,5	
	junge Blätter	0,8	
5 Jahre	alte Blätter	0,53	1,58
3 Monate	alte Blätter	0,55	1,85

Auf das Frischgewicht bezogen, läßt sich auch in Früchten ein Anstieg des Rutins beobachten. Mit dem Absterbeprozeß der Fruchtblätter nimmt es jedoch wieder deutlich ab (Tabelle 11).

Beide Tabellen zeigen somit übereinstimmend, daß keine direkten Beziehungen zwischen Rutinsynthese und Wachstum bestehen. Jugendliches Material scheint das Flavonol leichter zu bilden, während, wie Tabelle 11 zeigt, dieses Glykosid später sogar wieder abnimmt.

Tabelle 11. *Rutingehalt von Früchten im Laufe der Entwicklung*

	Gewicht von 100 Früchten bzw. Fruchtknoten	Rutingehalt je Frucht mg	Rutingehalt Frischgewicht %	Rutingehalt Trockengewicht %
Fruchtknoten	1,45	0,015	0,1	0,62
Frucht halb entwickelt, grün . .	11,0	0,066	0,06	0,33
Frucht entwickelt, grün	26,5	0,175	0,07	0,25
Früchte zum Teil braun	17,0	0,07	0,04	0,1
Früchte völlig braun	9,25	0,02	0,03	0,04

Bei etiolierten Keimlingen war von einem bestimmten Entwicklungsstadium ab trotz weiterer Zunahme des Frisch- und Trockengewichtes kein weiteres Ansteigen des Rutingehaltes mehr festzustellen. Im Gegenteil, die Werte sanken leicht ab. Dieses Phänomen läßt sich hier, wie bei den Früchten, zwanglos als Wiedereinbeziehen des Glykosids in den Stoffwechsel deuten, was Naghski (1947) bereits für *Forsythia* und King (1949) für *Sambucus* nachgewiesen haben (Tabelle 12). Der rasche

und völlige Abbau des Rutins, wie er in tierischen Zellen bereits nachgewiesen wurde (LANG, WEYLAND 1955) müßte auch im Pflanzengewebe möglich sein.

Tabelle 12. *Rutingehalt etiolierter Keimpflanzen*

Tage nach der Aussaat	Pflanzen 100 Stück Gewicht in g		Rutingehalt		
	frisch	getrocknet	je Keimling %	Frischgewicht mg-%	Trockengewicht %
14	15,2	1,5	2,5	16,5	0,12
21	19,4	1,9	2,8	11,0	0,12
28	22,0	2,0	3,0	15,5	0,16
35	23,0	2,0	3,3	14,5	0,16
56	28,0	2,4	3,0	9,4	0,1
63	30,8	2,8	2,8	9,0	0,1
70	32,0	3,2	2,7	9,4	0,094

Daraus geht hervor, daß das Wachstum nicht der einzig wesentliche Faktor für die Rutinsynthese ist, sondern daß dabei auch dem Licht eine ausschlaggebende Funktion zukommt.

Dabei muß zunächst noch offenbleiben, ob bei Fehlen bestimmter Wellenlängen nach Aufbrauchen gewisser Reservestoffe die Flavonolsynthese völlig zum Erliegen kommt oder ob durch Wiedereinbeziehen des Rutins in den Stoffwechsel eine eventuelle Neubildung überdeckt wird.

Der Einfluß des Lichtes wird auch dadurch sichtbar, daß bei Epidermis tragenden Stengeln sonnenbestrahltes Rindengewebe trotz gleichzeitiger Anthocyanbildung die 3—5fache Menge Rutin gegenüber lichtgeschützten Geweben enthielt. Dabei war es bedeutungslos, ob junge oder alte Pflanzen zur Untersuchung gelangten.

2. Anthocyan

a) Identifizierung. Mit Hilfe spezifischer Farbreaktionen, der Verteilung zwischen verschiedenen Lösungsmitteln und der Papierchromatographie wurde als Aglykon ausschließlich Cyanidin, als Zuckerkomponenten Glucose und Rhamnose festgestellt.

Es ist zwar interessant, daß das Reduktionsprodukt des vorhandenen Flavonolaglykons gefunden wurde, doch läßt sich allein daraus kein weitgehender Schluß ziehen, handelt es sich doch bei beiden Körpern um die verbreitetsten Vertreter ihres Typs.

Bemerkenswerter wird diese Feststellung jedoch dadurch, daß nach der Methode von BATE-SMITH (1954) Leukoanthocyane nicht entdeckt werden konnten. Somit wäre es möglich, daß der wahrscheinliche Vorgänger des Anthocyans das Flavonol ist (BANCROFT 1938, RUTZLER

1939). Dafür spräche im Sinne von Bancroft (1943), daß Licht für diese Reaktion notwendig ist, sowie die dazu erforderliche Zeit; ferner die gleichen Zuckerreste bei beiden Glykosiden. Andere Gesichtspunkte, die dem entgegenstehen, sollen in der Diskussion erörtert werden.

b) Lokalisation. Prinzipiell konnte in allen Organen Anthocyan festgestellt werden.

Bevorzugt und äußerlich am auffallendsten ist seine Bildung im Stengel, der tief violett gefärbt sein kann. Der Beginn der Farbausbreitung setzt bei der jungen Pflanze sowohl an der Basis wie an der Spitze ein. Ist der Stengel bereits stark violett oder wird die betreffende Stelle bevorzugt bestrahlt, so tritt bei jungem Gewebe die Farbe vom Blattgrund her auch in den Blattstielen auf und breitet sich in Ausnahmefällen unter günstigen Umständen (s. unten) bis in das Blatt hinein aus, an dem dann vor allem die Unterseite gefärbt ist.

Die Farbtiefe wird zunächst durch steigende Anthocyanmengen in den Epidermiszellen hervorgebracht, dann aber dadurch, daß auch die darunterliegende Zellreihe und manchmal weitere 3—4 Reihen den Farbstoff enthalten.

Bei fehlender Epidermis, z.B. in belichteter Wurzel, konnten bis zu 4 Zellreihen des äußeren, bzw. wenn dieses schon abgeworfen oder zusammengedrückt war, des inneren Rindenparenchyms gefärbt sein.

Bevorzugte Stellen der Anthocyanbildung sind die Umgebung von Achselsprossen, der Blattgrund und die angrenzenden Zellen von Spaltöffnungen und Sekretdrüsen, wobei diejenigen an den Nektarien des Diskus besonders leicht den Farbstoff bilden. Dieser tritt hier, im Gegensatz zu allen anderen Organen, bereits in der gerade gelblich gewordenen Blütenknospe, also ohne Belichtung, auf.

c) Die Anthocyanbildung und die sie beeinflussenden Faktoren. Die Raute zeigt normalerweise nur geringe Tendenz zur Anthocyanbildung.

Die hierzu notwendigen Voraussetzungen sind im wesentlichen die gleichen, die bereits allgemein aus der Literatur, vor allem aus den Übersichten von Gertz (1906) und Blank (1947) bekannt sind.

Aus der Lokalisation des Farbstoffes läßt sich erkennen, daß es besonders Orte intensiver Stoffumsetzungen sind, wo Anthocyan entsteht. Die Tendenz zur Anthocyanbildung ist daher auch bei sehr jungen Pflanzenteilen am größten. Im Verlauf des Wachstums nimmt sie ab und ist in ausgewachsenen Organen schließlich nur noch in Ausnahmefällen vorhanden.

Darüber hinaus zeigen Ringelungsversuche, daß die Stauung von Assimilaten die gleiche Wirkung hat. Der an die Ringelung grenzende Rindenteil, in dem sich die Assimilate ansammeln, besitzt dann eine anthocyanhaltige Epidermis. Sie befindet sich oberhalb der Ringelung,

wenn sich dort assimilierende Blätter befinden. Umgekehrt aber färbt sich im Frühjahr nur der unterhalb des Einschnittes liegende Teil, was mit der Mobilisierung der Kohlenhydrate in Zusammenhang stehen dürfte.

Fehlt der Assimilatestau, z. B. während der Winterruhe oder beim Übergang zur Assimilation im Frühjahr oder während der Ableitung der Assimilate in die reifenden Früchte, so bildet sich auch in der Nähe des Ringelschnittes kein Anthocyan aus, wohl aber, wenn man die Früchte abschneidet oder wenn sie ausgewachsen sind.

Während im Herbst absterbende Stengel und Blätter den Farbstoff fast nie hervorbringen, wird er im beginnenden Frühjahr meist darin gebildet.

Immer aber scheinen neben der besseren Kohlenhydratversorgung und einer optimalen Temperatur noch andere, innere Faktoren mitzuwirken, da sich gleiche Organe derselben Pflanze unter äußerlich gleichen Bedingungen verschieden verhalten können.

Der p_H-Wert [gemessen mit Polymetron (Zürich)] in den Epidermiszellen zeigt keine wesentlichen Unterschiede unabhängig davon, ob er bei grünen oder violetten, bei jüngeren oder älteren Pflanzen gemessen wurde. Er liegt um einen Mittelwert von 5,7. Somit scheinen p_H-Schwankungen weder durch das Anthocyan hervorgerufen zu werden, noch seine Bildung zu bewirken.

Von den äußeren Faktoren ist vor allem das Licht wesentlich. Abgesehen von den Nektarien als Orten sehr hoher Zuckerkonzentration, war die Anthocyanbildung stets lichtabhängig. Unter schon obengenannten günstigen Umständen war oft auch eine starke diffuse Bestrahlung für die Synthese des Farbstoffes ausreichend.

An Pflaumen u. a. Früchten stellte Arthur (1936) fest, daß auch abgeschirmte Stellen Anthocyan bilden können, was bei der Raute niemals der Fall war.

Unter sonst gleichen Bedingungen nahm die gebildete Anthocyanmenge sowohl mit der Dauer wie mit der Intensität der Belichtung zu. Bei Erreichen der Minimaldosis von 3—8 Stunden Licht setzte die Anthocyanbildung unabhängig von weiterer Belichtung nach 2—4 Tagen ein, auch wenn die Pflanze vor Eintritt der Färbung wieder verdunkelt wurde (s. Tabelle 13).

Normales Fensterglas verhindert die Färbung nicht, schwächt sie jedoch um ein geringes ab. Unter dem Rotfenster bleibt sie ganz aus.

Beschränkte Wasser- und Nährsalzzufuhr bewirken, möglicherweise durch Störung der Translokationsströmung und eine darauffolgende Anhäufung von Kohlenhydraten, Anthocyanbildung, was an geknickten und an fast völlig aus dem Boden gezogenen Pflanzen beobachtet werden konnte.

Tabelle 13. *Zur Anthocyanfärbung notwendige Belichtungszeit*

Belichtungszeit	1. Tag	3. Tag	4. Tag / 6. Tag	10. Tag / 40. Tag
3 Stunden	unverändert		unten Spuren von violett	mit bloßem Auge keine Färbung zu sehen
12 Stunden	unverändert	unten Spuren von violett	unten und oben leicht violett	violett über den ganzen Stengel, Mitte etwas
20 Stunden	unverändert	Stengel leicht gefärbt, Mitte nur Spuren	Stengel fast völlig violett	schwächer gefärbt wie zuvor, verstärkt

Verwundungen oder Parasiten verursachen Färbung an den betreffenden Stellen, was sich durch die erhöhten Stoffumsetzungen im verwundeten bzw. befallenen Gewebe leicht erklären läßt (Franke 1954).

Der Einfluß der Temperatur auf die Anthocyanproduktion ist oft untersucht worden. Bei *Ruta graveolens* wirkt eine niedere Temperatur begünstigend, ein weiteres Absinken unter das Optimum von etwa 10 bis 20° jedoch hemmend.

Ein Rückgang der Färbung durch Wiedereinbeziehung des Anthocyans in den Stoffwechsel scheint im Herbst so gut wie nicht stattzufinden, auch nicht nach mehrmonatigem Verdunkeln oder in Hungerkultur. Anthocyanhaltige Epidermiszellen werden an alten Pflanzen mit der ganzen Epidermis abgestoßen.

Im Frühjahr oder Sommer werden dagegen anthocyangefärbte Pflanzenteile größtenteils wieder grün. Das Anthocyan kann sogar zu dieser Zeit völlig verschwinden, so daß ein im Herbst und Winter violetter Stengel keine nachweisbaren Mengen dieses Farbstoffes mehr enthalten kann.

Auch schnell wachsende Teile, wie Blütenknospen tragende Stengel können vor der Streckung gebildetes Anthocyan wieder völlig verlieren.

Leukoanthocyane oder Katechine lassen sich auch in diesem Stadium nach der Methode von Bate-Smith (1954) nicht nachweisen. Ebenso fällt die Gerbstoffprobe negativ aus.

3. Katechin und Gerbstoffe

Die Anwesenheit von Gerbstoffen in der Weinraute wird in der einschlägigen Literatur äußerst selten vermerkt. Katechin wird überhaupt nicht aufgeführt. Auch in den vorliegenden Untersuchungen waren Gerbstoffe im Sinne der derzeitigen Abgrenzung dieses Begriffes (Herrmann 1952) nicht nachzuweisen. Da vor allem die Botaniker früher den Gerbstoffnachweis durch Farbreaktionen mit Fe III geführt haben, sind die positiven Angaben in dieser Richtung mit Vorsicht zu bewerten. Diese Reaktion gilt ja bekanntlich allgemein als Polyphenolnachweis,

auch für solche, die nicht als eigentliche Gerbstoffe angesehen werden können (HERRMANN 1952), wie z. B. Rutin. Das Katechin selbst konnte durch die an sich sehr scharfe Vanillin-Reaktion (BATE-SMITH 1954) weder in frischem noch in getrocknetem Material gefunden werden.

Besprechung der Ergebnisse

Bei *Ruta graveolens* steigt die Menge des gebildeten ätherischen Öles in der jungen Pflanze, abgesehen von den ersten Wachstumsstadien im Verhältnis zum Frisch- wie zum Trockengewicht, gleichmäßig an. Dies gilt unter Berücksichtigung der starken Wassereinlagerung auch für die etiolierte Pflanze. Damit bleibt bei dem einheitlichen Material von Keimlingen oder sehr jungen Pflänzchen der Prozentgehalt, auf Frisch-, als auch auf Trockengewicht bezogen, konstant. Bei ausgewachsenen nnd vor allem bei mehrjährigen Pflanzen werden durch gleichzeitiges Vorhandensein verschiedener Entwicklungsstadien, ferner durch unterschiedliche innere und äußere Wachstumsbedingungen die Ergebnisse unübersichtlicher. Bezogen auf das Trockengewicht ist die Menge des ätherischen Öles zwar auch hier im wesentlichen konstant. Dagegen nimmt sie in bezug auf das Frischgewicht zu, da der abnehmende Wassergehalt wachsender Pflanzen die Gewichtsrelation zugunsten des ätherischen Öles verschiebt. Übersichtliche Vergleichsmöglichkeiten ergeben sich damit nur, wenn gleiche Organe derselben Entwicklungsstufe untersucht werden.

Neben den bereits diskutierten Tatsachen (s. S. 332) weist auch der relativ hohe Gehalt der Früchte an ätherischem Öl bzw. an MNK auf eventuelle Zusammenhänge zwischen der Synthese des Samenfettes und des MNK hin. Allerdings kann von einer direkten Beziehung, etwa einer Ketonsynthese als Nebenweg des Fettsäureaufbaus auch hier nicht gesprochen werden, da die Hauptmenge des fetten Öles erst in einem späten Stadium erscheint. In diesem wird mindestens nicht mehr ätherisches Öl gebildet als in der ersten Entwicklungsphase der Früchte; in der fast kein fettes Öl im Samen vorliegt. Der gleichzeitige relativ hohe Lipoidanteil ist dafür kein Ausgleich. Die Sekretbehälter sind gleichmäßig in der Fruchtwand verteilt. Weder aus ihrer Lage noch aus ihrer Zahl lassen sich irgendwelche Beziehungen zwischen der Synthese des ätherischen Öles und der des fetten Öles ableiten.

Der durchaus denkbare Weg einer β-Oxydation oder β-Reduktion im Verlaufe der MNK-Synthese ist bereits diskutiert. Er stellt wohl eher einen Nebenweg allgemeiner Stoffwechselumsetzungen dar, der nicht speziell dem Fettsäureauf- oder -abbau dient.

Die Bildung des ätherischen Öles ist anscheinend direkt mit dem Wachstumsprozeß, zumindest aber mit dem allgemeinen Grundstoff-

wechsel, gekoppelt und wird auch beim Etiolement nur durch diesen beeinflußt. Dies kann von den Flavanderivaten nicht gesagt werden. Vielmehr scheint das Wachstum hierbei nur einen indirekten Einfluß auszuüben. Neben einer besonderen Labilität jugendlicher Zellen gewissen Eingriffen wie kurzwelligen Strahlen oder hoher Zuckerkonzentration gegenüber, ist dieser Einfluß vor allem darauf zurückzuführen, daß wachsende Zellen als Orte großer Stoffansammlungen und -umsätze die notwendigen Bausteine am besten zur Verfügung stellen können. Viele Beobachtungen weisen auch darauf hin, daß es vor allem die Orte großer Stoffumsetzungen sind, die das Reservoir der sekundären Pflanzenstoffe darstellen (Frey-Wyssling, Blank 1943; Paech 1950, 1954; Paech u. Eberhardt 1952; Treibs 1953). Nöll (1955) fand bei *Fagopyrum*-Arten einen Zusammenhang zwischen Flavonsynthese und Photosynthese.

Während das Flavonol nur quantitativ vom Licht beeinflußt wird, ist dieses zur Anthocyanbildung fast immer erforderlich. Nur im Bereich der Nektarien findet bezeichnenderweise auch ohne Licht die Synthese dieses Farbstoffes statt. Daß es sich auch hier um einen Ort starker physiologischer Aktivität handelt, zeigt die Arbeit von Ziegler (1955).

Das Vorkommen der beiden leicht ineinander überführbaren Aglykone und der entsprechenden Zuckerkomponenten könnte im Sinne von Bancroft (1943) und Rutzler (1939) als Reduktion des Flavonols zum Anthocyanidin gedeutet werden, zumal ein Leukoanthocyanidin nicht nachweisbar war und das p_H des Zellsaftes nach Lang und Weyland (1955) die Reduktion begünstigt. Hierzu nimmt Bancroft an, daß die Flavone durch Enzyme photosensibilisiert werden. Es ist dann aber nicht einzusehen, warum in diesem Falle die anschließende Reduktion etwa 2 Tage benötigen soll. Dazu kommt bei der Raute noch, daß die Wirkung des Lichtes keine direkte ist, da nach Verabreichung der notwendigen Dosis sich das Anthocyan auch im Dunkeln bildet.

Stephens (1948) diskutiert 2 Möglichkeiten der Anthocyanentstehung. Die erste, daß die Flavone zunächst in einen „precursor" zurückverwandelt werden und dann erst daraus das Anthocyan sich bildet, ist bei der Raute nicht anzunehmen, da durch Belichtung das Rutin nicht ab-, sondern ebenfalls zunimmt und das Anthocyan fast ausschließlich an Orten entsteht, die einen gewissen Überschuß an Assimilaten aufweisen, womit für beide Pigmente genügend Bausteine zur Verfügung stehen. Damit wird die wahlweise Entstehung aus nahe miteinander verwandten Vorstufen wahrscheinlich. Der 2. Vorschlag von Stephens nimmt sogar einen gemeinsamen Vorgänger an.

Die Rhamnose, der eine Zuckeranteil des Rutins und des Anthocyans, kann im keimenden Samen erst dann nachgewiesen werden, wenn auch

bereits Rutin vorhanden ist. Daraus jedoch irgendwelche Schlüsse auf die Flavon-Synthese zu ziehen, erscheint verfrüht.

Mit SEYBOLD (1954) kann man das Erscheinen des violetten Farbstoffes auch hier als Zeichen physiologischer Unstimmigkeit werten. Dies dürfte primär der Grund seines Entstehens sein, während ökologische Betrachtungen, wie etwa die des Nutzeffektes durch Lichtfilterwirkung des Farbstoffes (SHIBATA und Mitarb. 1916, CZIMMER, JENAY 1940 u. a.) oder die Beteiligung an einem Redoxsystem (NOACK 1922; HUSZAK 1937; ENDRES und Mitarb. 1939; KÜHNAU 1949; PAECH 1950 u. a.) und andere, zum Teil widerlegte Hypothesen nur sekundäre Bedeutung haben.

Die Synthese des Rutins beim etioilerten Keimling, sowie die Anthocyanbildung im Dunkeln nach vorhergegangener Belichtung und ohne Licht im Bereich der Nektarien, lassen darauf schließen, daß der wesentliche Faktor beim Aufbau der Flavanderivate ein Enzym ist, das im allgemeinen wohl erst durch kurzwelliges Licht gebildet bzw. aktiviert wird. Die Bedeutung dieser Wellenlängen für die Anthocyansynthese geht auch aus den Arbeiten von SCHANZ (1920), ARTHUR (1936) und BRAUN (1939) hervor. Neben dieser vermutlich direkten photochemischen Wirkung muß jedoch wenigstens zum Teil auch eine indirekte, über eine Stoffwechselsteigerung verlaufende, in Erwägung gezogen werden. So hat MONTFORT (1950) festgestellt, daß kurzwelliges Licht durch Zerstörung von Zellinhaltsstoffen die Pflanze zu verstärkter Atmung zwingt (SCHEFFER und WELTE 1955).

Es sei hier noch eingefügt, daß die Raute auch noch andere Phenylpropankörper enthält, nämlich das Cumarin (NESTLER 1901; REPPEL 1954) und das Bergapten (BRANDT 1915; SPÄTH 1937; MÜHLEMANN 1938), die biogenetisch wohl eng mit den Flavanderivaten zusammenhängen (KARSTENS 1939, GEISSMANN und HINREINER 1952; SCHMID 1953).

Möglicherweise lassen sich alle genannten Verbindungen auf dieselben oder auf nahe miteinander verwandte Grundbausteine zurückführen. Unter den gegebenen Bedingungen würden diese niedermolekularen, aktiven Körper über einen Seitenweg des Stoffwechsels zu den sekundären Pflanzenstoffen zusammengesetzt werden. Ein eventueller Nutzeffekt wäre somit für die Pflanze zunächst akzessorisch, was aber nicht ausschließt, daß er für sie im Verlauf der Entwicklung wesentlich wird.

Da die Stoffwechselumsetzungen im allgemeinen sehr rach erfolgen und Zwischenprodukte nur selten isoliert werden können, sind wir in den meisten Fällen bezüglich des Reaktionsmechanismus bei der Entstehung der Stoffwechselprodukte auf Analogieschlüsse angewiesen. Hier sind es vor allem die Arbeiten mit radioaktiven Isotopen, die wertvolle Hinweise liefern.

So deuten gewisse Beobachtungen darauf hin (TREIBS 1953), daß das als hypothetischer Grundkörper so wichtige Isopren durch anaerobe

Verbrennung von intermediären Stoffwechselprodukten, wie sie im Krebszyklus anfallen, gebildet wird. Daß es sich hier um für die Entstehung sekundärer Stoffe allgemeingültige Bedingungen handelt, geht aus der Feststellung LETTRÉS (1954) hervor, daß der „metabolic pool" während der Zellteilung und des Zellwachstums auf einen glykolytisch arbeitenden Stoffwechsel eingestellt ist, d.h. daß diese Vorgänge mit unvollständiger Oxydation einhergehen (ERICKSON 1947; STERN und KIRK 1947; HAAS 1955). Isotopenversuche zeigen dabei, daß Glucose unter diesen Bedingungen nicht in Milchsäure und CO_2, sondern vorwiegend in Ribose der Nucleinsäuren, in Aminosäuren und Lipoide verwandelt wird (ZIEGLER 1954; HAAS 1955). Abgesehen von gewissen Intermediärprodukten, die nur beim aeroben Stoffwechsel gebildet werden (Citronensäurezyklus), ist es vor allem auch die Kombination erhöhter Zwischenproduktkonzentration (anaerob) und erhöhter Energielieferung (aerob), die optimale Bedingungen für das Wachstum schafft. Seit WARBURG wissen wir, daß es kein Wachstum ohne Glykolyse gibt, und POTTER sieht das Wachstum überhaupt als eine Folge eines Anstaues von Intermediärprodukten an (HOLZER 1953). Diese Feststellungen sind hier vor allem deshalb so wesentlich, weil die Synthese des ätherischen Öles direkt, die der Flavanderivate zum Teil mit dem Wachstum zusammenhängt.

Der bereits angedeutete Seitenweg (shunt-metabolism im Sinne von FOSTER 1947), der zur Synthese sekundärer Pflanzenstoffe führt, wird dann eingeschlagen, wenn wesentliche Stoffe oder Faktoren für einen Normalumsatz fehlen. So ließ es sich wahrscheinlich machen, daß beim Fehlen von Oxalacetat im Krebszyklus Ketonkörper entstehen (GREEN 1953; LYNEN 1954; ZIEGLER 1954). Dies erscheint im Hinblick auf die bereits diskutierte MNK-Synthese sehr bemerkenswert, zumal auch für isoprenoide Verbindungen ein derartiger Entstehungsweg nachweisbar ist (JOHNSTON und Mitarb. 1954; GROB und BÜTLER 1955).

Bei den Flavanderivaten herrscht bezüglich der Vorstufen dieser Farbstoffe keine Übereinstimmung. Die Ergebnisse von EDDY und MAPSON (1951) deuten nach PAECH (1954) darauf hin, daß kleinere Bausteine das Anthocyanmolekül bilden. KURSANOW (1951) führt auf Grund seiner Arbeiten mit Isotopen die Entstehung von Polyphenolen im Tee auf die Zucker selbst, nicht auf ihre Bruckstücke zurück. Dieser Meinung sind allgemein bezüglich flavonoider Körper auch GEISSMANN und HINREINER (1952). Eine ähnliche Diskrepanz besteht in der Beurteilung der Entstehung steroider Verbindungen (DJAO und YOUNGKEN 1955).

Beide Auffassungen lassen sich jedoch miteinander vereinbaren, da wir wissen, daß die Resynthese der Glukose aus Brenztrauben- oder Milchsäure (Corizyklus) drei- bis viermal häufiger über den Krebszyklus (KREBS 1954) als über die einfache Umkehr der Glykolyse verläuft

(STUMPF 1954; ZIEGLER 1954). Dies heißt, daß selbst dann, wenn die aromatischen Ringe der Polyphenole direkt aus Zuckern bzw. phosphorylierten Zuckern entstehen, sie doch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit über den Citronensäurezyklus oder die Brenztraubensäure gebildet wurden. Die Bedeutung des Krebszyklus für Synthesen kommt in einigen neueren Arbeiten (KATZ und CHAIKOFF 1955) zum Ausdruck. Die zentrale Stellung von Co A (LIPPMANN 1954 und 1955; CHAIKOFF 1954) wurde bereits auf S. 332 erörtert. In neuester Zeit hat auch RUCKENBROD (1955) ähnliche Gedanken über die Biogenese der Chlorogensäure geäußert.

Die Untersuchungen GREENBERGS (1954) über die wahrscheinlichen Vorgänger aromatischer Ringe weisen nun darauf hin, daß Zyklisierung von Glucose, Kondensation von drei C_2- oder zwei C_3-Einheiten, ferner Krebszyklusintermediäre als direkte Vorgänger des Benzolringes ausgeschlossen werden müssen. Dagegen bleibt der Weg über Heptosen offen. Durch die Entdeckung des Glucose-6-phosphat-zyklus (AXELROD und Mitarb. 1953) wäre in dem Sedoheptulosephosphat ein durchaus möglicher Ausgangsstoff für die Ringbildung gefunden. Darüber hinaus haben die Arbeiten von CALVIN (1955) ohnehin die wesentliche Rolle des Sedoheptulosephosphats bei der Assimilation aufgezeigt.

Diese Überlegungen machen auch die Ergebnisse von DJAO verständlich. Wahrscheinlich werden sie vor allem durch die Arbeit von FRIEND und Mitarb. (1955), die feststellten, daß die Karotinoidsynthese von Glucose weniger rasch beeinflußt wird als von Acetat.

Zusammenfassung

1. Die pharmakognostisch wichtigen Inhaltsstoffe der Weinraute werden im Hinblick auf ihre Biogenese untersucht.

2. In histologischen, cytologischen und quantitativen Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Synthese des ätherischen Öles und das Wachstum direkt miteinander gekoppelt sind.

3. Die das ätherische Öl produzierenden Sekretzellen sind endomitotisch polyploidisiert. Das in den Zellen vorgebildete Öl wird in schizogen entstandene Intercellularen ausgeschieden und diese lysigen erweitert.

4. Hauptbestandteil des ätherischen Öles ist das MNK, das auch im genuinen Öl nachgewiesen wurde.

5. Veränderungen in der Zusammensetzung des ätherischen Öles wurden an Früchten untersucht.

6. An Hand von Versuchsergebnissen wird die Entstehung des MNK über die β-Oxydation bzw. die β-Reduktion diskutiert.

7. Von Inhaltsstoffen mit einem Flavangerüst wurde außer dem Rutin ein Anthocyan mit dem Aglykon Cyanidin und den beiden Zuckerkomponenten Glucose und Rhamnose nachgewiesen.

8. Das Rutin entsteht mit Beginn der Keimung; im Samen ist kein Flavonol vorhanden.

9. Leucoanthocyane im Sinne von BATE-SMITH und Katechine fehlen in der Raute. Ebenso sind Gerbstoffe nach der Definition von GNAMM nicht nachzuweisen.

10. Im Gegensatz zum ätherischen Öl ist die Synthese der Flavanderivate vom Wachstum relativ unabhängig. Dagegen bestehen enge Verbindungen zwischen der Synthese dieser Stoffe und dem Umsatz und der Anhäufung von Assimilaten.

11. Die Entstehung der Anthocyane durch Reduktion von Flavonolglykosiden, sowie aus Leucoanthocyanen im Sinne von BATE-SMITH konnte nicht nachgewiesen werden. Der Aufbau dieser Stoffe aus miteinander verwandten, kleineren Bauelementen wird angenommen.

12. Die Synthese von ätherischem Öl und Flavanderivaten wird im Sinne des „shunt-metabolism" von FOSTER diskutiert.

13. Die Flavanderivate werden in den Stoffwechsel wieder mit einbezogen, das ätherische Öl nicht.

Literatur

ACKLIN, OSKAR: Ein Beitrag zum Problem der Methylketonbildung aus Triglyceriden bzw. Fettsäuren im Stoffwechsel des Schimmelpilzes. II. Biochem. Z. **204**, 253—274 (1929). — ARTHUR, J.M.: Radiation and Anthocyanin Pigments. Biological Effects of Radiation, Bd. II, p. 1109—1118. New York-London 1936. — AVIGNAN, J., J.H. QUASTEL and P.G. SCHOLEFIELD: Studies of Fatty Acid Oxidation. Biochemic. J. **60**, 329—334 (1955). — AXELROD, B., R.S. BANDURSKI, C.M. GREINER and R. JANG: The Metabolism of Hexose and Pentose Phosphates in Higher Plants. J. of biol. Chem. **202**, 619—634 (1953). — BANCROFT, W.D.: The Biochemistry of Anthocyanins. Science [Lancaster, Pa.) **98**, 98—100 (1943). — BANCROFT, W.D., and J.E. RUTZLER: Die Kolloidchemie von Blatt- u. Blütenfarbstoffen. J. Amer. chem. Soc. **60**, 2738—2743 (1938). — BATE-SMITH, E.C.: Leuco-Anthocyanins. I, II. Biochemic. J. **58**, 122—125, 126—132 (1954). — BATE-SMITH, E.C., and R.G. WESTALL: Chromatographic Behaviour and Chemical Structure. I. Biochim. et biophysica Acta **4**, 427—440 (1950). — BERGER, FRANZ: Handbuch der Drogenkunde, Bd. 4 Herbae, S. 431. 1954. — BERNHARD, N.: Neuere Ergebnisse der Stoffwechselforschung mit Hilfe der Isotopentechnik. Beiträge zur Anwendung der Isotopentechnik in Biologie, Klinik und Therapie, S. 19—48. 1950. — BLANK, F.: The Anthocyanin Pigments of Plants. Bot. Review **13**, 251—317 (1947). — BLOCH, K.: Interrelationships of Lipid and Carbohydrate Metabolism. Annual Rev. Biochem. **21**, 273—300 (1952). — BONNER, JAMES: Plant Biochemistry. New York: Acad. Press 1950. — BRANDT, W.: Zur Anatomie und Chemie der Ruta graveolens. Arbeiten aus dem Pharmakologischen Institut Berlin 1914 u. Diss. 1915. Arch. Pharmaz. **262**, 160 (1924). — BRAUN, WERNER: Untersuchungen über den Einfluß langwelliger UV-Strahlen auf die Inhaltsstoffe ver-

schiedener Arzneipflanzen. Beitr. Biol. Pflanz. **26**, 331—400 (1939). — CALVIN, M.: Der photosynthetische Zyklus. Vortrag: Tagg d. Ges. d. Chem. 1955 München (12. Sept.) 1955. — CHAIKOFF, I.L., and G.W. BROWN jr.: Fat Metabolism and Acetoacetate Formation. Chemical Pathways of Metabolism, p. 277—347. New York 1954. — CHIBNALL, A.CH., and ST.H. PIPER: The Metabolism of Plant and Insect Waxes. Biochemic. J. **28** (II), 2209—2219 (1934). — CRAMER, FR.: Papierchromatographie, 2. Aufl. 1953. — CROCKER, W., and L.V. BARTON: Physiology of Seeds. Waltham, Mass. USA 1953. — CZIMMER, A.G., u. A. v. JENEY: Über die schützende Wirkung der Flavonfarbstoffe gegen Sonnenlicht. Tagg d. Ungar. Physiolog. Ges. Budapest. Ref. Ber. Physiol. **121**, 658 (1940). — DAKIN, H.D.: Synthese einiger natürlich vorkommender aliph. Ketone durch Oxydation der zugehörigen gesättigten Fettsäuren mit H_2O_2. J. of biol. Chem. **4**, 221 (1908). — DAOUD, K.M., H.G. OSMAN and M.K. SALAH: Über die Fettumwandlung in Rizinussamen während der Keimung. Pharm. Soc. Egypt. **34**, 180—210 (1952). — Ref. Pharmaz. Ztg **100**, 22—23 (1955). — DEKKER, JOH.: Die Gerbstoffe. Berlin 1913. — DEUFEL, J.: Zytologische Untersuchungen an sezernierenden Zellen. Naturwiss. **41**, 41—42 (1954). — DJAO, E.H., and H.W. YOUNGKEN jr.: A Study of C^{14} Labeled Acetate in Digitalis Purpurea Glycoside Biosynthesis. J. Amer. Pharmaceut. Assoc., Sci. Ed. **44**, 321—325 (1955). — DUPERON, R.: Les glycides des graines oléagineuses. Rev. gén. Bot. **61**, 261—284 (1954). Ref. Ber. Biol. **92**, 351 (1954). — ECKEY, E.W.: Vegetable Fats and Oils. Amer. Chem. Soc. Monogr. Ser. **1954**. — EDDY, B.P., and C.W. MAPSON: Some Factors affecting Anthocyanin Synthesis in Cress Seedlings. Biochemic. J. **49**, 694—699 (1951). — ENDRES, G., R. HÜTTEL u. C. KAUFMANN: Zur Kenntnis der Blattpigmente. Liebigs Ann. **537**, 205—213 (1939). — ESDORN, ILSE: Tagesperiodische Schwankungen im Flavonolgehalt von Fagopyrum-Arten und ihre Ursachen. (Freiburg) auch Planta (Berl.) **45**, 376—378 (1955). — Untersuchungen über die Veränderlichkeit des Rutingehaltes bei Fagopyrumarten. Hauptverslg. dtsch. pharm. Ges. 21.—23. Okt. 1955. Ref. D.A.Z. **95**, 1050 (1955). — ERICKSON, RALPH O.: Respiration of Developing Anthers. Nature (Lond.) **159**, 275—276 (1947). — FLASCHENTRÄGER, B., u. E. LEHNARTZ: Physiologische Chemie II, Der Stoffwechsel I, S. 766, 807, 809, 819, 836—37. 1955. — FRANKE, WOLFGANG: Über die Biosynthese des Vitamins C. I. Planta (Berl.) **44**, 437—458 (1954). — FREY-WYSSLING, A., u. F. BLANK: Untersuchungen über die Physiologie des Anthocyans in Keimlingen von Brassica oleracea L. var. capitata L. f. rubra L. Ber. schweiz. bot. Ges. A **53**, 550—578 (1943). — FRIEND, J., T.W. GOODWIN and L.A. GRIFFITHS: Studies in Carotenogenesis. Biochemic. J. **60**, 649—655 (1955). — GÄNSHIRT, HERBERT: Vergleich verschiedener, aus den unterirdischen Organen von Aristolochia clematis L. gewonnener äther. Öle mit Hilfe einer chromatographischen Methode. Pharmaz. Industr. **15**, 177—180 (1953). — GEISSMANN, T.H., and E. HINREINER: Theories of the Biogenesis of Flavonoid Compounds. Bot. Review **18**, 77—244 (1952). — GERTZ, OTTO: Studier öfver Anthocyan. Lund 1906. — GILG, E., u. P.N. SCHÜRHOFF: Die Entwicklung der Sekretbehälter bei den Umbelliferen und Rutaceen. Arch. Pharmaz. **268**, 7—13 (1930). — GNAMM, H.: Die Gerbstoffe und Gerbmittel. Stuttgart 1949. — GOGRÖF, G.: Diss. Karlsruhe 1955. — GUENTHER, ERNEST: The Essential Oils, vol. II. 1949. — GRAHLE, A.: Zur Lokalisation des äther. Öls im Sproß von Mentha pip. Pharmazie **10**, 494—500 (1955). — GREEN, DAVID E.: Fatty Acid Oxidation in Solubile Systems of Animal Tissues. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **29**, 330—366 (1954). — GREENBERG, DAVID M.: Synthetic Processes Involving Amino Acids. Chemical Pathways of Metabolosm, Bd. II, p. 113—147. New York 1954. — GROB, E.C., u. R. BÜTLER: Über einen möglichen Weg der Biosynthese der Carotinoide bei Mucor hiemalis. Experientia (Basel) **11**, 259—260 (1955). — GRÜN, AD.: Analyse der Fette und Wachse, Bd. I. 1925. — HAAS, JOH.: Physiologie der Zelle.

Berlin: Bornträger 1955. — Haberlandt, G.: Über den Entleerungsapparat der inneren Drüsen einiger Rutaceen. Sitzgsber. ksl. Akad. Wiss. Wien, Abt. I **107** (1898). — Hänsel, R. (München): Zur Kenntnis der Flavone. Mitt. dtsch. pharm. Ges. **22**, 91 (1952). — Hänsel, R., u. L. Hörhammer: Vergleichende Untersuchungen über die Flavonglykoside der Betulaceen. Arch. Pharmaz. **285**, 117—226 (1954). — Heeger, E. F., u. K. Brückner: Heil- und Gewürzpflanzen. Berlin 1950. — Hegauer, R.: Gedanken über die theoretische Bedeutung der chemisch-ontogenetischen und chemisch-systematischen Betrachtung von Arzneipflanzen. Pharmaceut. Acta helv. **29**, 203—220 (1954). — Herrmann, K.: Nachweis und Bestimmung der Gerbstoffe in Drogen. Pharmazie **7**, 320—325 (1952). — Hilditch, Thomas Percy: The Chemical Constitution of Natural Fats, Bd. II. London: Chapman & Hall Ltd. 1949. — Hinshelwood, Cyril: Adaptive Enzymes. Brit. Med. Bull. **9**, 150—153 (1953). — Hörhammer, L., u. R. Hänsel (München): Nachweis und Bestimmung von Rutin neben Quercetin. Arch. Pharmaz. **284** (56), 276—280 (1951). — Isolierung eines Rhamnazinesters aus Polygonum hydropiper. Arch. Pharmaz. **285**, 153—158 (1953). — Hoffmann-Ostenhof, Otto: Enzymologie. Wien: Springer 1954. — Holzer, Helmut: Über Fermentketten, Biologie und Wirkung der Fermente, S. 89—112. 1953. — Hoppe, Heinz A.: Drogenkunde. Hamburg 1947. — Huszák, St.: Über die Funktion des Peroxydase-Systems der Pflanzen. Hoppe-Seylers Z. **247**, 239—247 (1937). — Johnson, G. Dana: A new Preparation of 2,4-Dinitrophenylhydrazones. J. Amer. chem. Soc. **73**, 5888—5889 (1951). — Johnston, J. A., D. W. Racusen and J. Bonner: The Metabolism of Precursors in a Plant System. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **40**, 1031—1037 (1954). Ref. Ber. Biol. **97**, 54 (1955). — Karrer, P.: Anthocyane. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. III/II/2, S. 941ff. 1932. — Karstens, W. K. H.: Anthocyanin and Anthocyaninformation in Seedlings of Fagopyrum esculentum Moench. Rec. Trav. bot. néerl. **36**, 85—179 (1939). — Katz, J., and I. L. Chaikoff: Synthesis via the Krebs Cycle in the Utilisation of Acetate by Rat Liver Slices. Biochim. et biophysica Acta **18**, 87—101 (1955). — Kaufmann, H. P., u. W. H. Nitsch: Die Papierchromatographie auf dem Fettgebiet XVI. Fette u. Seifen **56**, 154—158 (1954). — King, A., C. Burton and A. E. Schwarting: The Occurence of Rutin in Sambucus Canadens. J. Amer. pharmaceut. Assoc. Sci. Ed. **38**, 531—532 (1949). Kinzel, Wilh.: Frost und Licht als beeinflussende Kräfte bei der Samenkeimung 1913, S. 40; Erläuterungen und Ergänzungen zum I. Buch 1915, S. 46; Abschluß der Erläuterungen und Ergänzungen zum I. Buch 1920, S. 103. — Klein, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse III, Spezielle Analyse II, organ. Stoffe II, 2. Hälfte, S. 874. 1932. — Klug, J.: Über die Sekretdrüsen bei den Labiaten und Compositen. Diss. Univ. Frankfurt 1926. — Koelle, Gunhild: Untersuchungen über die Drüsenschuppen des Majoran (Majorana hort. M.) und ihre Beeinflussung durch Düngung, Wassermangel und Beschattung. Diss. Karlsruhe 1952. — Koslowski, Antoni: A simplified Method of the Isolation of the Flavon and Anthocyan Compounds. Acta Soc. Bot. Poloniae **22**, 441—443 (1953). — Krebs, H. A.: Some Aspects of the Energy Transformation in Living Matter. Brit. Med. Bull. **9**, 97—104 (1953). — The Tricarboxylic Acid Cycle. Chemical Pathways of Metabolism, V. I, p. 109—171. New York 1954. — Kursanow, A. L.: Die Bedeutung der Isotopen und andere neue biologische Arbeitsmethoden für die Entscheidung landwirtschaftlicher Fragen. Izv. Akad. Nauk SSSR. Ser. Biol. **1954**, Nr 1, 8—19. Ref. Ber. Biol. **92**, 58 (1954). — Lang, K., u. H. Weyland: Über den Stoffwechsel des Rutins und Quercetins. Biochem. Z. **327**, 109—117 (1955). — Lang, Konrad: Die Biologie der Enzyme. Biologie und Wirkung der Fermente. Heidelberg: Springer 1953 (Colloqu. Ges. physiolog. Chemie Mosbach 17./18. April 1953, S. 1—31, 1953. — Lawrence, W. I. C., I. R. Price and G. M a. R. Robinson: A Survey of Anthocyanins V. Biochemic. J. **32** (II), 1661—1667 (1938). —

Lettré, Hans: Neuere Ergebnisse der Krebsforschung. Naturwiss. Rdsch. **7**, 101—110 (1954). — Lipmann, Fritz: Development of the Acetylation Problem, a personal Account. Science (Lancaster, Pa.) **120**, 855—865 (1954). — Coenzyme A and Biosynthesis. Amer. Scientist **43**, 37—47 (1955). — Lippmaa, Theodor: Über Pigmenttypen und ihre Bedeutung für die Anthocyaninfrage. Ber. dtsch. bot. Ges. **46**, 267—277 (1928). — Lynen, F.: Participation of Coenzyme A in the Oxidation of Fat. Nature (Lond.) **174**, 962—965 (1954). Ref. Ber. Biol. **96**, 269—270 (1955). — Lynen, F., u. E. Reichert: Zur chemischen Struktur der „aktivierten Essigsäure". Angew. Chem. **63**, 47—48 (1951). — Mandelstam, J.: Studies in Biochemical Adaptation. The "Mass Action" Theory of Enzyme Adaptation. Biochemic. J. **51**, 674—681 (1952). Ref. Chem. Zbl. **126**, 10534 (1955). — Mandelstam, J., and John Yudkin: Studies in Biochemical Adaptation. Biochemic. J. **51**, 681—686, 686—693 (1952). — Matthes, Ewald: Physiologische Untersuchungen über Umwandlungen des Öls in keimenden Sonnenblumensamen. Bot. Archiv **19**, 79—135 (1927). — Meara, M. L.: Fats and other Lipids. In Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. II, S. 317—402. Heidelberg: Springer 1955. — Micheel, Fr., u. H. Schweppe: Papierchromatographische Trennung hydrophober Substanzen mit acetyliertem Cellulosepapier. Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta **1954 I**, 53—63 (1954). — Micheel, Fr., u. H. Schweppe: Papierchromatographische Trennung höherer Fettsäuren mit Zelluloseacetat-Papier. Angew. Chem. **66**, 136—137 (1954). — Möbius, Martin: Die Farbstoffe der Pflanzen. In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. I, Abt. 1, Teil: Cytologie, Bd. III. 1927. — Mörike, Klaus D.: Mathematische Erörterungen zur Meßmethodik von nichtrunden Zellkernen. Anat. Anz. **100**, 87—99 (1953). — Montfort, C.: Zur Frage der Atmungssteigerung grüner Laubblätter durch ultraviolettreiche Strahlung. Planta (Berl.) **38**, 119—122 (1950). — Mühlemann, H.: Über die kumarinähnlichen Bestandteile von Herba Rutae. Pharmac. Acta helv. **13**, 45 (1938). — Apotheker-Ztg **1938**, 1440. Ref. Jber. Pharmaz. **73**, 51 (1938). — Über die kumarinähnlichen Bestandteile von Herba Rutae. Pharmac. Acta helv. **13**, 300 (1938). — Chem. Zbl. **1939 I**, 4810. Ref. Jber. Pharmaz. **74**, 46 (1939). — Nagkski, J., W. L. Porter and J. F. Couch: Isolation of Rutin From Two Varieties of Forsythia. J. Amer. chem. Soc. **69**, 572—573 (1947). — Neuberg, C.: Schimmelberichte (1919, S. 151), 1920, S. 140. — Nestler, A.: Der direkte Nachweis des Cumarins und Thëins durch Sublimation. Ber. dtsch. bot. Ges. **19**, 350—361 (1901). — Noack, Kurt: Physiologische Untersuchungen an Flavonolen und Anthocyanen. Z. Bot. **14**, 1—74 (1922). — Nöll, G.: Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Flavonolgehalt von Fagopyrum esculentum Moench u. Fagopyrum tataricum (L.) Gärtner. Pharmazie **10**, 609—615, 679—691 (1955). — Paech, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. In Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. I/2. Berlin: Springer 1950. — Stoffwechsel organischer Verbindungen. II. Fortschr. Bot. **15**, 313—347 (1952) (1954). — Paech, K., u. F. Eberhardt: Untersuchungen zur Biosynthese der Anthocyane. Z. Naturforsch. **7 b**, 664—670 (1952). — Paris, R.: Biochemische und pharmakologische Untersuchungen über das Rutosid (Rutin). Bull. sci. Pharmacol. **43** (38), 279—283 (1936). — Chem. Zbl. **1936 II**, 3323. Ref. Jber. Pharmazie **71** (1936). — Pfau, Alex. St.: Über ein natürliches Vorkommen von Methyl-n-oktyl-keton. Helvet. chim. Acta **15**, 1267—1270 (1932). — Études sur les matières végétales volatiles IX, Sur quelques constituants inédits de l'huile essentielle de rue. Helvet. chim. Acta **22**, 382—391 (1939). — Polonovski, Michel: Medizinische Biochemie, 5. Aufl., S. 494, 496. 1951. — Popovici, Radu: Entwicklungsgeschichtlich-anatomische Untersuchungen über die Samen von Ruta graveolens. Pharmaz. Mh. **7**, 63—65 (1926). — Price, J. R. and V. C. Sturgess: A Survey of Anthocyanins. VI. Biochemic. J. **32** (II), 1658—1660 (1938). — Reppel, L.: Über natürliche Cumarine. Pharmazie **9**, 278—299 (1954). —

Robinson, G.M., and R. Robinson: A Survey of Anthocyanins. I. Biochemic. J. **25** (II), 1687—1705 (1931). — A Survey of Anthocyanins. II. Biochemic. J. **26**, 1646—1664 (1932). — A Survey of Anthocyanins. III. Biochemic. J. **27** (I), 206—212 (1933). — A Survey of Anthocyanins. IV. Biochemic. J. **28** (II), 1712—1720 (1934). — Ruckenbrod, Heidi: Untersuchungen über den Umsatz der Chlorogensäure in höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **46**, 19—45 (1955). — Rutzler jr., J.E.: The Precursors of the Anthocyanins of Autumn Foliage. J. Amer. Chem. Soc. **61**, 1160—1163 (1939). — Scheffer, Fritz, u. Erwin Welte: Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde. II. Pflanzenernährung. Stuttgart 1955. — Schlotterbeck, Julius Otto: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte pharmakognostisch wichtiger Samen. Diss. Bern 1896. Ref. Bot. Jber. **25**, 528 (1897). — Schmid, H.: Natürlich vorkommende Chromone. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **11**, 124—179 (1954). — Schratz, E., u. M. Spaning: Die Anzahl der Drüsenhaare als Maßstab für den Ölgehalt der Lavendelblüten. Dtsch. Heilpflanze **10**, 1—3 (1944). — Seybold, A.: Untersuchungen über den Farbwechsel von Blumenblättern, Früchten und Samenschalen. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. 1953/54, 2. Abh. **1954**. — Shibata, K., I. Nagai and M. Kishida: The Occurence and Physiological Significance of Flavonederivates in Plants. J. of biol. Chem. **28**, 93—108 (1916). — Sieck, Willy: Die schizolysigenen Sekretbehälter. Jb. wiss. Bot. **27**, 197—242 (1895). — Souèges, René: Embryogénie des Rutacées. C. r. Acad. Sci. Paris **180**, 1957—1959 (1925). — Späth, Ernst: Die natürlichen Cumarine. Ber.dtsch. chem. Ges. A **70**, 83—117 (1937). — Stärkle, Max: Die Methylketone im oxydativen Abbau einiger Triglyceride (bzw. Fettsäuren) durch Schimmelpilze unter Berücksichtigung der besonderen Ranzidität des Kokosfettes. Biochem. Z. **151**, 371—415 (1924). — Stahl, Egon: Untersuchungen über die Drüsenhaare, das Azulen und das ätherische Öl der Schafgarbe (Achillea millefolium). Diss. Karlsruhe 1952. — Eine neue Apparatur zur gravimetrischen Erfassung kleinster Mengen ätherischer Öle. Mikrochem. vereinigt mit Mikrochim. Acta **60**, 367—372 (1953). — Stern, Herbert, and Paul L. Kirk: The Oxygen Consumption of the Mikrospores of Trillium in Relation to the Mitotic Cycle. J. gen. Physiol. **31**, 243—248 (1947). — Stumpf, P.K.: Glycolysis. Chemical Pathways of Metabolism, Bd. I, p. 67—108. New York 1954. — Täufel, K., u. R. Pohloudek-Fabini: Keimfähigkeit und Gehalt an Citronensäure beigelagerten Pflanzensamen. Biochem. Z. **326**, 317—321 (1954). — Das Verhalten der Zitronensäure bei der Keimung von Cerealien-, Leguminosen- und Ölsamen. Biochem. Z. **326**, 280—287 (1955). — Täufel, K., u. H. Thaler: Zur Chemie der Ketonranzigkeit der Fette. Chemiker-Ztg **1932**, 265—266. — Über eine Farbreaktion auf Ketone. Z. physiol. Chem. **212**, 256—262 (1932). — Täufel, K., u. H. Thaler (Alberdinck): Über das Samenfett der Weinraute (Ruta graveolens). Fettchem. Umschau **41**, 198 (1934). — Täufel, K., H. Thaler u. O. Bauer: Über das Samenfett der Weinraute (Ruta graveolens). Fettchem. Umschau **43**, 55—56 (1936). — Zur Frage der Beziehung zwischen Fetten und ätherischen Ölen. Fette u. Seifen **43**, 131—133 (1936). — Täufel, K., H. Thaler u. H. Hohner: Über den qualitativen Nachweis von Methylketonen. Z. Unters. Lebensmitt. **74**, 119 (1937). — Täufel, K., H. Thaler, u. M. Martinez: Zur Chemie der „Ketonranzigkeit" der Fette. III. Margarine-Industr. **26**, 37—39 (1933). — Thaler, H., A. Schottmayer, I. Stählin u. H. Beck: Zur Chemie der Fettranzigkeit. V. Biochem. Z. **320**, 87—98 (1949). — Torres, Jesus Cabo: Estudio farmacognostico de la hoja de Ruda (Ruta graveolens). Farmakognosia Anales (Madrid) **10** (18), 275—361 (1950). — Treibs, Wilhelm: Zur Biochemie und Biogenese der Inhaltsstoffe äther. Öle. Sitzgsber. dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Math. u. allg. Naturwiss. 1953, Nr 6, **1953**, 1—18. — Trozzolo, A. M., and E. Lieber: The Hydroxylamine Number. Analyt. Chemistry **22**, 764—768 (1950). — Tschermak-Wöess, E., u. G. Hasitschka: Veränderungen

der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum u. verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma (Heidelberg) **5**, 574—614 (1953). — Tschernuchin, A.: Prozeß der Bildung des äther. Öls im Koriander. Russ. Arbeit (Woronesch). Ref. Chem. Zbl. **1929 II**, 583. — Virtanen, Arthuri I.: Neue Amino- und Ketosäuren in grünen Pflanzen und die Biosynthese der Aminosäuren. Angew. Chem. **67**, 381—388 (1955). Wehmer, C.: Die Pflanzenstoffe Bd. I, p. 610. 1929. — Weiling, Franz: Über volumetrische Untersuchungen an den Labiatendrüsen der Pfefferminze (Mentha pip. L.). Arch. Pharmaz. **284**, 185—196 (1951). — Weitzel, Günther, H. Schön, F. Gey u. H. Kalbe: Stoffwechselversuche mit Fettsäuren mittlerer Kettenlänge. I, II, III. Hoppe-Seylers Z. **301**, 118—155 (1955). — Whelan, W.I.: Starch, Glycogen, Fructosans and similar Polysaccharides. In Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. II, S. 145—196. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Ziegler, E.: Neuere Ergebnisse über die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels. Bull. Galenica (Bern) **1954**, Abdruck in Materia Medica Nordmark 1954/55. — Ziegler, Hubert: Phosphataseaktivität und Sauerstoffverbrauch des Nektariums von Abutilon striatum Dicks. Naturwiss. **42**, 259—260 (1955). Ref. Ber. Biol. **99**, 65 (1955). — Zeller, Alfred: Untersuchungen über die Umwandlung höherer Fettsäuren in Kohlenhydrate bei der Keimung von Kürbissamen. I. Jber. wiss. Bot. **82**, 122—157 (1936).

Meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. U. Weber †, der mir die Anregung zu dieser Arbeit gab, und Herrn Professor Dr. H. Kühlwein, der sie freundlicherweise übernommen und stets gefördert hat, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Dr. E. Sprecher, Karlsruhe,
Botanisches Institut der Technischen Hochschule, Kaiserstraße 2

Planta, Bd. 47, S. 359—373 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

AUTOMIXIS, GESCHLECHTSBESTIMMUNG UND PYKNOSE VON GONENKERNEN BEI CYMBELLA ASPERA

Von

LOTHAR GEITLER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Februar 1956)

Einleitung

Viele oder vielleicht die meisten pennaten Diatomeen folgen bei der Kopulation einem bestimmten Typus: zwei diploide Mutterzellen legen sich aneinander und machen die Meiose durch; nach der Telophase I erfolgt eine Cytokinese, welche zwei Tochterprotoplasten, das sind die zukünftigen Gameten, ergibt; in jedem Tochterprotoplasten erfolgt die II. Teilung, je einer der beiden Gonenkerne wird pyknotisch und im Plasma resorbiert, der überlebende wird zum Gametenkern. Jede Mutterzelle bildet somit zwei — morphologisch isogame — Gameten, die, nachdem sie sich in charakteristischer Weise umgelagert haben, mit den Gameten der anderen Mutterzelle kopulieren, und zwar derart, daß je ein Gamet der einen Mutterzelle in die andere überwandert, während der andere an Ort verharrt; jede Mutterzelle enthält somit einen Wander- und einen Ruhegameten. Dieses Verhalten, das für *Gomphonema*, *Cymbella*, *Achnanthes* u. a. bezeichnend ist (GEITLER 1954), kann mancherlei habituelle Modifikationen erfahren, so bei *Nitzschia subtilis*, *Amphipleura* u. a. (GEITLER 1952 c); immer aber entsteht in jeder Mutterzelle ein Wander- und ein Ruhegamet.

Hieraus ergibt sich eine bestimmte Problematik hinsichtlich der Geschlechtsbestimmung, wenn man die Sexualitätstheorie MAX HARTMANNS (1953, 1955) als einzige allgemein-biologisch tragkräftige Anschauung zugrunde legt. Es bestehen zwei Deutungsmöglichkeiten: 1. Jede Mutterzelle bildet einen männlichen (beweglichen) und einen weiblichen (passiven) Gameten; die Mutterzellen sind Zwitter, ihre Paarung ist nicht der Ausdruck ihrer sexuellen Konstitution; determinierend wirkt die I. Anaphase oder ein später hinzutretender Unterschied der Schwesterprotoplasten. 2. Schon die Mutterzellen sind sexuell determiniert, also männlich oder weiblich; je ein Wander- und Ruhegamet ist folglich gleichgeschlechtig, der Unterschied im Bewegungsverhalten ist nicht der Ausdruck physiologischer Anisogamie, sondern durch den Kopulationsmechanismus und durch zufällige Altersunterschiede bedingt.

Beiden Auffassungen stehen Schwierigkeiten entgegen. Im ersten Fall muß, da die verschiedengeschlechtigen Gameten einer Mutterzelle nicht miteinander kopulieren, zusätzlich irgendeine Art von Selbststerilität angenommen werden. Diese Zusatzannahme ist allerdings dadurch unterbaut, daß *ausnahmsweise* bei normalerweise allogamen Arten Kopulation der Gameten einer Mutterzelle vorkommt, was dafür spricht, daß ein sonst vorhandener Hemmungsmechanismus aufgehoben wurde. Eine wohl größere Schwierigkeit besteht darin, daß ein besonderer Mechanismus angenommen werden muß, der bewirkt, daß in den Mutterzellpaaren immer die richtigen, d. h. verschiedengeschlechtigen Gameten derart nebeneinander zu liegen kommen, daß sie miteinander kopulieren können; entsprechend den Bedingungen, die durch die Organisation der Art gegeben sind, muß dieser Vorgang ganz bestimmt und in gegenseitiger Abhängigkeit der Gametenpaare voneinander geregelt sein. Wodurch er, bei der prägamen Umlagerung der Gameten, durchgeführt werden sollte, ist schwer vorstellbar. Schließlich spricht in vielen Fällen, so bei *Gomphonema-*, *Amphipleura-* und *Cymbella*-Arten (GEITLER 1932, 1952c, 1954) der Augenschein sehr für eine bloß mechanische Bedingtheit der Kopulationsbewegung der Wandergameten.

Gegen die zweitgenannte Auffassung sprechen die für die erstgenannte anzuführenden Argumente, so vor allem die gelegentliche Kopulation der Gameten einer Mutterzelle bei dem normalerweise allogamen *Gomphonema parvulum* (GEITLER 1932), ebenso die ausnahmsweise Pädogamie bei *Synedra ulna*, die allerdings in jeder Mutterzelle zwei Wander- und zwei Ruhegameten bildet (GEITLER 1939), schließlich auch die obligate Pädogamie unter Ausbleiben der Paarung der Mutterzellen bei *Gomphonema constrictum* var. *capitata* (GEITLER 1952b) sowie der hier geschilderte Fall von *Cymbella aspera*[1]; außerdem gibt es auch obligate Autogamie, so bei bestimmten Formen von *Denticula tenuis* (GEITLER 1953). Für die Fälle obligater Pädo- oder Autogamie könnte allerdings angenommen werden, daß eben hier die Geschlechtsbestimmung anders erfolgt und eben dies der Grund für das Ausbleiben der Paarung der Mutterzellen ist.

Eine Entscheidung zwischen beiden Auffassungen ist z. Zt. nicht möglich (vgl. meine ausführlichen Erörterungen 1932, 1949, 1953). Im folgenden kann es sich zunächst nur um die Vermehrung des Tatsachenmaterials handeln. Es wird ein neuer — nach *Gomphonema constrictum* der zweite bekannte — Fall von obligater Pädogamie beschrieben. Gleichzeitig läßt sich die Frage behandeln, was bewirkt, daß je ein Gonenkern in jeder Tochterzelle zugrunde geht.

[1] Einen unsicheren, weil unvollständig untersuchten Fall von obligater Pädogamie stellt eine Rasse vom *Cymbella ventricosa* var. I dar (GEITLER 1932, S. 147; vgl. auch weiter unten).

Beobachtungstatsachen

Das Untersuchungsmaterial stammte aus einer kleinen Wiesenquelle bei Schladming (Steiermark), in der im August 1955 reichlich *Cymbella aspera* in Auxosporenbildung auftrat[1]. Die Art ist auf Grund ihrer charakteristischen Merkmale leicht bestimmbar. Die Längenvariation betrug: Zellen von Kopulationsgröße 215—154 μ, selten auch nur bis 130 μ lang, Auxosporen und Erstlingszellen 292—308 μ lang; HUSTEDT gibt 70—265 μ an. Die Größenvariation der Auxosporenmutterzellen ist auffallend weit. Die kleineren Zellen sind, übereinstimmend mit sonstigen Erfahrungen, gedrungener als die großen (Abb. 2c). Der Chromatophor ist, wie bei den meisten *Cymbella*-Arten, eine Platte, die der dorsalen Gürtelseite anliegt, in der Mitte aber vom Gürtel jäh abgehoben ist und sich ins Zellinnere konvex vorwölbt. Hier liegt ein Pyrenoid, das aber oft in mehrere, maximal in sechs bis acht Teilstücke zerfallen ist (Abb. 3a), ohne daß sich eine Beziehung zur Zellteilung oder Gametenbildung erkennen ließe: in allen Stadien können ganze oder zerteilte Pyrenoide auftreten. Entlang der Schalen ist der Chromatophor, wie gewöhnlich bei Cymbellen, in je zwei, im ganzen also in acht schmale, gegen die Pole gerichtete Lappen geteilt.

Die Untersuchung wurde im Leben und nach Alkohol-Eisessig-Fixierung in Essigkarmin durchgeführt. Zur Beobachtung gelangten außer vegetativen Zellen *mehrere hundert* in Auxosporenbildung befindliche. Die meisten enthielten Lepto- und Pachytäne, also die vor der Kopulation am längsten dauernden Stadien. Auxosporen und Erstlingszellen waren in verhältnismäßig geringer Anzahl vorhanden; die Auxosporenbildung befand sich offenbar in ihrem Beginn.

Die Auxosporenbildung erfolgt typischerweise *ohne Paarung* in *isolierten Mutterzellen*, die in der gleichen Weise wie bei Arten mit gepaarten Mutterzellen je zwei Gameten bilden; die beiden Gameten einer Mutterzelle kopulieren miteinander, aus der Zygote entsteht die Auxospore[2]. Unter der großen Menge in allen Stadien der Auxosporenbildung beobachteten Mutterzellen befanden sich allerdings vier Fälle, die Paarung zeigten, und zwar in der für andere *Cymbella*-Arten bezeichnenden Weise unter Berührung mit den Ventralseiten und unter Ausbildung einer gemeinsamen, festen Kopulationsgallerte. Alle vier Paare befanden sich im Stadium des Pachytäns, so daß nicht entschieden

[1] Gleichzeitig bildete auch *Caloneis silicula* var. *truncatella* Auxosporen; es entstehen aus zwei Mutterzellen vier Gameten und allogam zwei Zygoten bzw. Auxosporen.

[2] Vielleicht ebenso erfolgt unter Umständen die Auxosporenbildung von *Cymbella ventricosa* var. I (GEITLER 1932, S. 147); die damalige Annahme, es handle sich um Parthenogenese oder Autogamie beruhte darauf, daß in dem spärlichen Material keine Gameten beobachtet wurden und daß die Möglichkeit ihrer Bildung nicht in Betracht gezogen wurde.

werden kann, ob Fremdkopulation erfolgt oder ob, trotz Paarung, die Gameten eines Partners miteinander kopulieren. Das Verhalten zeigt, daß die Paarungsfähigkeit nicht völlig verlorengegangen ist; — die gleiche Erscheinung findet sich übrigens auch bei parthenogenetischen Rassen von *Cocconeis placentula* und ist dort ein funktionsloses Rudiment (die Paarung führt hier *nicht* zur Kopulation). Bei *Cymbella aspera* handelt es sich um eine so seltene Erscheinung, daß die Pädogamie, d. h. die Kopulation der Gameten einer isolierten Mutterzelle, als obligat bezeichnet werden muß; um so mehr, als nicht einmal feststeht, daß im Fall der Paarung nicht dennoch Automixis erfolgt.

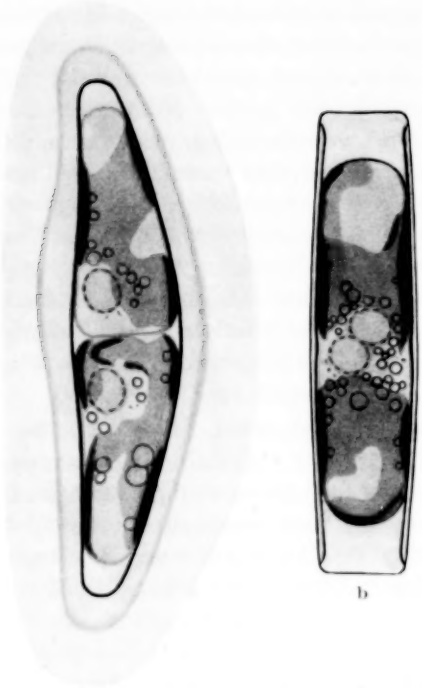


Abb. 1a u. b. a Mutterzelle in ihrer Gallerte mit fertiggestellten Gameten; b eben gebildete Zygote. — Nach dem Leben; um die Kerne herum liegen Tangentialplättchen. Maßstab wie Abb. 2

In zwei Fällen, also als besonders seltene Ausnahmen, wurden Mutterzellen beobachtet, die junge Zygoten enthielten, die aber statt eines Kernpaars und zweier pyknotischer Kerne (siehe unten) nur einen funktionierenden und einen pyknotischen Kern enthielten. Der funktionierende Kern entsprach in Größe und Struktur nicht einem Fusionskern, sondern einem somatischen Kern — auch sind die Gametenkerne in jungen Zygoten sonst nie fusioniert —, so daß die Annahme naheliegt, daß es sich um *Azygoten* handelt, die eine Pseudomeiose in einem Teilungsschritt unter Abort des einen Tochterkerns und ohne Cytokinese, wenn auch mit Teilung des Chromatophors, durchgemacht haben. Der Zellinhalt besaß normales Aussehen und es waren zwei Tochterchromatophoren vorhanden.

Im einzelnen ist der Ablauf der Gametenbildung mit allen seinen Begleitumständen genau der gleiche wie bei Arten mit typischer Allogamie. Die Mutterzellen scheiden zunächst Gallerte aus, welche in einen schwach lichtbrechenden äußeren und einen dichteren, festen inneren Teil differenziert ist (Abb. 1a). Die Theken rücken wie vor

einer vegetativen Teilung, aber vielleicht nicht so weit, auseinander[1]. Hierauf erfährt der wie im vegetativen Zustand ventral liegende Kern die I. meiotische Teilung, welcher eine äquale Cytokinese folgt, die ebenfalls wie bei einer vegetativen Teilung in pervalvarer Richtung nebeneinanderliegende Tochterprotoplasten ergibt (Abb. 3, 4b, c). In ihnen läuft die II. meiotische Kernteilung ab; in der frühen Telophase wird je ein Tochterkern pyknotisch (Abb. 3, 4). Damit sind die Gameten gebildet, die sich nun in gewohnter Weise derart umlagern, daß sie in apikaler Richtung übereinander zu liegen kommen (Abb. 1a, 2a); die Umlagerung beruht, wie auch sonst, offensichtlich auf dem Abkugelungsbestreben der Protoplasten und dem Anstreben einer Gleichgewichtslage, wobei im beengten Raum die bekannten Zwangsformen entstehen. Unterschiede morphologischer Art zwischen den Gameten lassen sich nicht feststellen. Offenbar bald, denn reife Gameten sind nur selten auffindbar, erfolgt die Kopulation, die eine walzenförmige, in der Längs- und Querrichtung symmetrische Zygote liefert (Abb. 2b, 4d). Daraus läßt sich schließen, daß die Kopulation isogam und vermutlich einfach durch Verschmelzung entlang der Berührungszone der Gameten erfolgt. Unter Wachstum, Auseinanderdrängung der Theken, Resorption der pyknotischen Kerne und Verschmelzung der überlebenden entwickelt sich die Zygote zur Auxospore. Die Chromatophoren liegen zunächst, wie es dem Zusammentreten der Gameten entspricht, polar einander gegenüber (Abb. 1b); schon zu Beginn des Auxosporenwachstums strecken sie sich, wandern auf die Längsseiten, und zwar auf die zukünftigen *Gürtel*seiten, an denen sie bis zur Fertigstellung der Auxospore einander gegenüberliegen; vor der ersten Teilung der Erstlingszelle müssen sie schalenständig werden; es herrschen also die gleichen Verhältnisse wie bei *Gomphonema constrictum* (Geitler 1952b). Die Auxospore besitzt ein „quergeringeltes" Perizonium, das sich bei der Bildung der 1. Schale der Erstlingszelle abhebt (Abb. 2c)[2]. Die Lage der Achsen der Erstlingszelle ist gegenüber der Mutterzelle fixiert: wenn die Erstlingszelle in Schalenansicht liegt, zeigt die Mutterzelle die Gürtelansicht; abgesehen von zufälligen Verrutschungen einer Mutterschale (z. B. in Abb. 2c links) sind also die Pervalvarachsen um 90° gedreht, während die Apikalachsen parallel liegen; das Verhalten ist in dieser Hinsicht das gleiche wie bei *Cymbella sumatrensis* (Geitler u. Mack).

Die Meiose verläuft im allgemeinen in der für Diatomeen überhaupt charakteristischen Weise. Die für eine eingehende Untersuchung und

[1] Vgl. die Fußnote S. 369.

[2] Bei der Bildung der beiden ersten Schalen laufen, wie allgemein, so auch bei *Cymbella aspera* zwei metagame Mitosen ab, die an den jeweils entstehenden pyknotischen Kernen kenntlich sind.

chromosomale Analyse unzureichend fixierten Präparate — sie zeigen reichlich Chromosomenverklumpungen, dabei sind mindestens 40 Tetraden vorhanden — wurden nicht weiter ausgewertet. Doch sei auf die

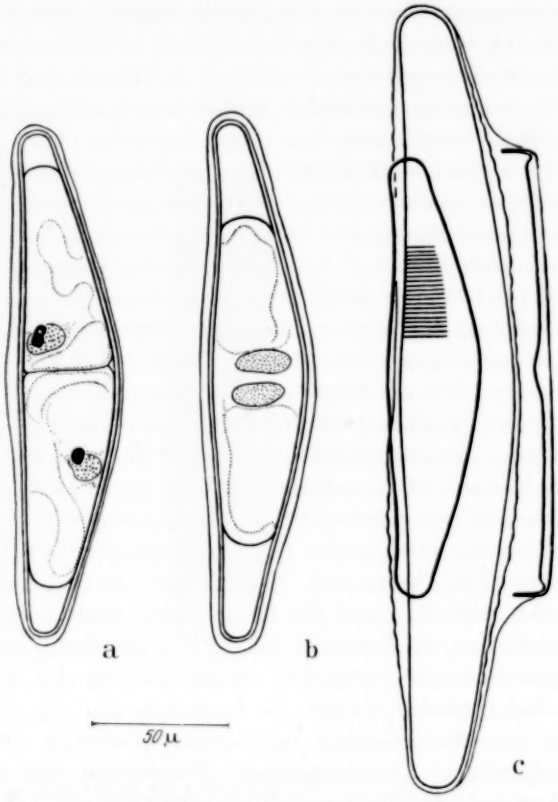


Abb. 2a—c. a Mutterzelle mit fertiggestellten Gameten, die pyknotischen Kerne liegen in Deckung mit den rekonstruierten. b Zygote nach Resorption der pyknotischen Kerne. c Erstlingszelle mit 1. Schale innerhalb des Perizoniums, anhaftend die Schalen der Mutterzelle, deren eine — im Bild links — verrutscht und daher in Schalenansicht zu sehen ist. Kopulationsgallerte in a—c stark geschrumpft; in a und b sind Chromatophoren und Plasmabrücke angedeutet, in c ein Teil der Streifung der 1. Schale dargestellt. — Alk.-Eisess., Essigkarmin

besonders extreme Abflachung des Spindelquerschnitts in der I. Metaphase hingewiesen, die durch die parietale Lage an der ventralen Gürtelseite hervorgerufen wird (Ab. 3a). Die gleiche Erscheinung zeigt sich übrigens in der somatischen Mitose von *Nitzschia sigmoidea* (LAUTERBORN) und von *Synedra* (BELAR, Abb. 48c), weniger extrem und nur kenntlich an der Asymmetrie des Chromosomenrings in Polansicht bei *Cyclotella* und bei *Navicula radiosa* (GEITLER 1952a, 1951a). Auffallend ist ferner die starke Zerstreuung der Dyaden über die Spindel in der

späten I. Anaphase (Abb. 3c). Zum Teil entsteht der Eindruck, als ob manche Dyaden den Zusammenhang mit der Spindel überhaupt verloren hätten und im Plasma lägen. Dabei erfolgt die Zerstreuung typisch

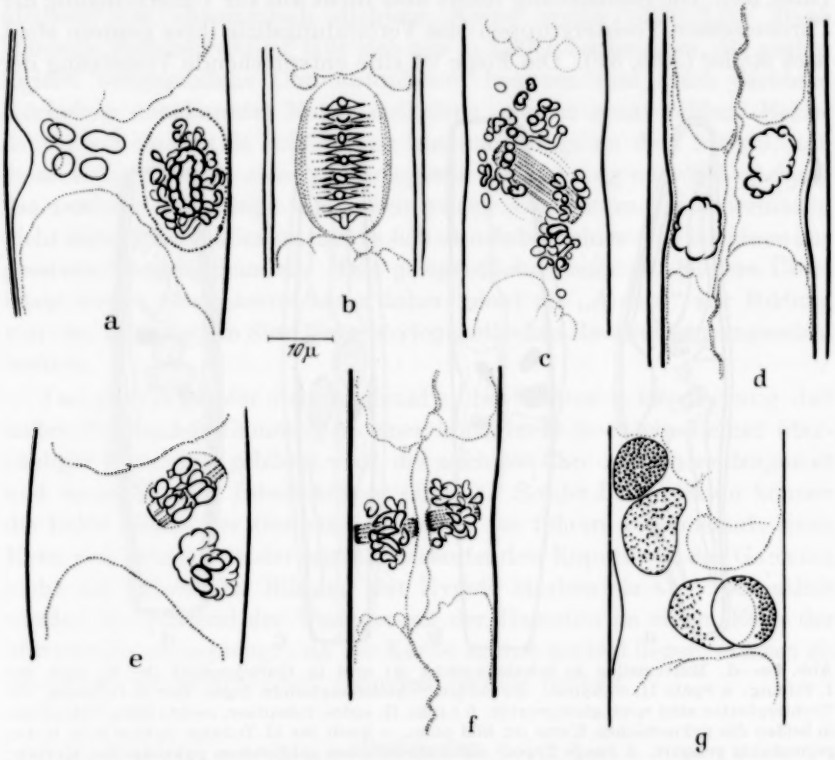


Abb. 3a—g. Ausschnitte aus der Mitte von Mutterzellen in Gametenbildung. a Schalenansicht, links Teilstücke des Pyrenoids, rechts I. Metaphase in Polansicht; um die Zentralspindel ringförmige Ansammlung der Centromerenregionen der Chromosomen(paare), äußere Spindelgrenze punktiert. b Gürtelansicht, rechts und links Chromatophorenlängsschnitte; frühe I. Metaphase im Profil, Zentralspindel nicht erkennbar, auffallende Polkappenartige Struktur. c Gürtelansicht, späte I. Anaphase; vom Spindelapparat ist hauptsächlich nur die Zentralspindel erkennbar. d Gürtelansicht, späte I. Telophase, vollzogene Cytokinese. e Schalenansicht, II. frühe Anaphasen, in verschiedenen Höhen — nämlich in den beiden sich deckenden Tochterprotoplasten — liegend (die linke „hoch", fast im Profil, die rechte „tief" und in schräger Ansicht). f Gürtelansicht, II. Prometaphase; die Spindeln, besonders die rechte, stehen etwas schräg, aber beide ungefähr in pervalvarer Richtung; nur die Zentralspindeln erkennbar. g Gürtelansicht, nach der II. Teilung, die pyknotischen Kerne ausnahmsweise weitgehend rekonstruiert; die beiden Kernpaare entsprechend ihrer Lage in den beiden sich deckenden Gameten in verschiedenem Niveau. — Alk.-Eisess. Essigkarmin

unsymmetrisch in bezug auf die Zentralspindel (Abb. 3c): die Ursache liegt in der Raumbehinderung, d. h. in der „zu kurzen" Pervalvarachse der Zelle, die in den Figg. b und c horizontal liegt. Die Kürze des Abstands zwischen den beiden Schalen im Verein mit dem Festhalten der Lage der Spindelfigur an der Ventralseite der Zelle bewirkt auch eine

charakteristische Drehung der Spindel; in der Metaphase liegt sie zunächst, wie bei einer somatischen Mitose, in pervalvarer Richtung (Abb. 3b), im Lauf der anaphasischen Verlängerung stellt sie sich allmählich steiler (Abb. 3c). Die Steilstellung reicht aber nicht aus zur Unterbringung der Chromosomen-Tochtergruppen: die Verbindungslinie ihrer Zentren steht *noch* steiler (Abb. 3c). Die Folge ist eine entsprechende Versetzung der

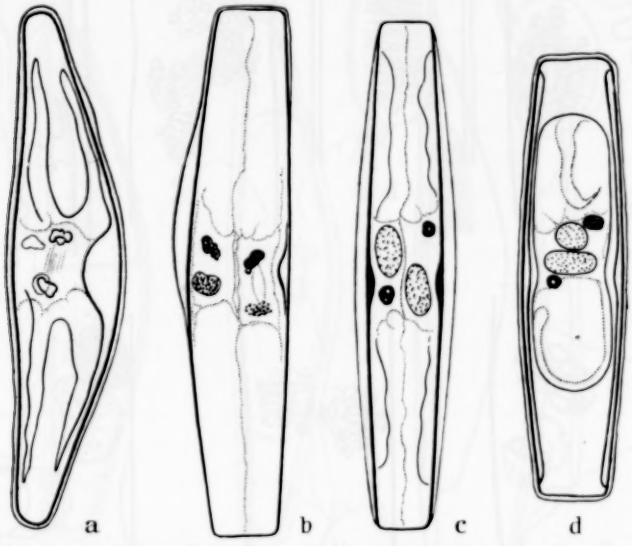


Abb. 4a—d. Mutterzellen in Schalenansicht (a) und in Gürtelansicht (b—d) nach der I. Teilung. a Späte II. Anaphase, die beiden Schwesterspindeln liegen fast in Deckung, die Tochterplatten sind noch gleichwertig. b Links II. späte Telophase, rechts frühe Telophase, in beiden die pyknotischen Kerne im Bild oben. c Nach der II. Teilung, pyknotische Kerne gegensinnig gelagert. d Junge Zygote mit noch erhalten gebliebenen pyknotischen Kernen; ein Gametenkern im Quer-, der andere im Längsschnitt. In a, b, d ist die geschrumpfte Kopulationsgallerte dargestellt, in c zum Umriß der Ventralseite (dick ausgezogen) auch der Umriß der Dorsalseite dazugezeichnet. — Alk.-Eisess., Essigkarm.; Maßstab wie Abb. 1 und 2

Telophasekerne und deren unsymmetrische Lage in der Plasmabrücke (Abb. 3d). Die Interkinesekerne wandern aber wieder in die Mitte der Plasmabrücke, so daß sich die II. Teilungen in gleicher Höhe abspielen (Abb. 3f). Auch in der II. Teilung entstehen die Spindeln in pervalvarer Richtung (Abb. 3f), drehen sich aber infolge Raumbehinderung während der anaphasischen Streckung, und zwar sehr kräftig, nämlich fast bis um 90° (vgl. Abb. 3f mit 4a, b). Sie liegen im übrigen weiterhin an der Ventralseite, zeigen aber zueinander beliebige, offenbar zufällige Stellungen (Abb. 3e); erst in der späten Anaphase werden sie meist und dann zwangsläufig parallel ausgerichtet (Abb. 4a, b). Diese Umstände sind von einer gewissen Bedeutung für die Beurteilung der Ursachen, die für das Zugrundegehen eines Tochterkerns maßgebend sein könnten.

Die Pyknose eines Tochterkerns erfolgt normalerweise in der frühesten Telophase, d. h. die eine Tochterplatte wird überhaupt nicht rekonstruiert (Abb. 4b). In vereinzelten Ausnahmefällen erfolgt eine Rekonstruktion, die aber im Vergleich zu den normal rekonstruierten Kernen kleinere und chromatisch dichtere Kerne ergibt (Abb. 3g). Diese abnorme Rekonstruktion läßt sich nur in Zellen beobachten, die pathologisch aufgequollene Chromatophoren besitzen und stark färbbare Körnchen unbekannter Natur enthalten, welche sonst fehlen. Beides deutet auf eine vitale Schädigung hin und nötigt zu dem Schluß, daß diese Zellen infolge einer physiologischen Hemmung oder Schwächung das normale frühzeitige Absterben zweier Gonenkerne gewissermaßen nicht durchführen können, daß es sich also dabei keineswegs um einen nur passiven Vorgang handelt. Das gelegentliche abnorme, längere Überleben zweier Gonenkerne kann daher nicht als „Anlauf" zur Bildung von vier Gameten im Sinn einer phylogenetischen Reminiszenz angesehen werden.

Das gleiche gilt für die manchmal zu beobachtende Erscheinung, daß außer den beiden Gameten in einer Mutterzelle noch ein kleiner überzähliger Protoplast gebildet wird, der auch ein Chromatophorenfragment und sonst normale Inhaltskörper enthält. Solche Protoplasten können die halbe Größe der Gameten erreichen, sie führen aber niemals einen Kern und nehmen an der normal verlaufenden Kopulation der Gameten nicht teil. Nach der Bildung der Zygote sterben sie ab. Vermutlich werden sie während der Umlagerung der Gameten an einem Ende der Mutterzelle abgesprengt; da die Kerne immer zentral liegen, müssen sie schon aus topographischen Gründen kernlos bleiben.

Diskussion

Die abortierenden Gonenkerne gehen bei *Cymbella aspera* denkbar früh zugrunde und die reifen Gameten enthalten von Anfang an nur einen einzigen funktionierenden Kern. Dieses Verhalten ist, in mehr oder weniger deutlicher Ausprägung, auch bei anderen Diatomeen die Regel. Bei *Navicula radiosa* erfolgt dagegen völlige Rekonstruktion, die Gameten sind zweikernig und in der Zygote bilden sich *zwei* Kernpaare; erst später wird ein Kernpaar pyknotisch (Geitler 1952d). Ähnlich verhält sich *Navicula cryptocephala*, die aber je Mutterzelle nur einen einzigen Gameten bildet (Geitler 1952e).

Die Frage nach den Ursachen für das Zugrundegehen eines Kerns und die Frage, ob es sich um einen bestimmten der beiden Tochterkerne handelt, wurde noch kaum ernstlich behandelt (vgl. nur Geitler 1952b, S. 477, v. Stosch, S. 344, 345). Die übersichtlichen Verhältnisse bei *Cymbella aspera* erlauben eine etwas genauere Analyse, die allerdings kein sicheres Ergebnis liefert. Grundsätzlich bestehen drei Deutungs-

möglichkeiten. 1. Es sind im Gametenprotoplasten nicht die ernährungsphysiologischen Bedingungen gegeben, welche die Entwicklung von zwei Kernen ermöglichen; es geht daher einer, und zwar ein beliebiger, zugrunde. 2. Die II. Mitose spielt sich in inhomogenem Plasma ab, d. h. die eine Tochterplatte gelangt in ein Plasmaareal oder in eine Region des Spindelpols, deren Beschaffenheit die Rekonstruktion nicht gestattet; die II. Mitose wäre also hinsichtlich des Plasmas differentiell. 3. Die II. Mitose verläuft auf Grund einer bestimmten genetischen und cytologischen Situation chromosomal inäqual. Ein Mechanismus, aus dem sich das Ergebnis hypothetisch ableiten läßt, wäre z. B. folgender: ein Chromosom enthält das Faktorenpaar AB, das homologe das Paar ab; regelmäßiges crossing-over ergibt die vier Chromatiden AB, Ab, aB und ab; lebensfähig sind nur AB und ab, während Ab und aB letal wirken; die beiden betreffenden Kerne werden also eliminiert, die Gameten erhalten immer wieder die Konstitution AB und ab, woraus sich Zygoten ABab ergeben.

Die erstgenannte Auffassung ist die nächstliegende und für sie sprechen besonders auch Fälle des späten Zugrundegehens eines Kernpaars in der Zygote wie bei manchen *Navicula*-Arten. In der gleichen Weise lassen sich zwanglos auch die beiden Mitosen verstehen, die bei der Bildung der ersten Schalen in den Auxosporen ablaufen und die je einen pyknotischen Tochterkern liefern: denn der Protoplast der Auxospore befindet sich offensichtlich nicht in einem prophasischen Zustand, der mit dem vor einer vegetativen Mitose gleichzusetzen ist und der die Bildung zweier Tochterkerne ermöglicht; dieser Zustand ist erst nach der Bildung der Schalen und vor der ersten Teilung der Erstlingszelle gegeben, bei deren Beginn sich der Protoplast unter dem üblichen Auseinanderrücken der Theken sichtlich vergrößert; zu einem solchen Auseinanderrücken besteht übrigens bei der Erstbildung der Theken gar keine mechanische Möglichkeit. Ein analoger Zustand im Plasma wäre für die Situation während der Meiose anzunehmen.

Die Vorstellung bereitet aber gewisse Schwierigkeiten in Fällen besonders frühzeitigen Zugrundegehens einer Tochterplatte, wie dies bei *Cymbella aspera* geschieht; denn es ist nicht einzusehen, weshalb nicht, wenigstens manchmal, *beide* Kerne unter den ernährungsphysiologisch ungünstigen Bedingungen leiden sollten.

Hier wäre übrigens einschaltungsweise auf eine damit zusammenhängende Problematik hinzuweisen. Setzt man in Anlehnung an die offenbar regelmäßigen Verhältnisse, die in Meristemen von Blütenpflanzen herrschen (vgl. dazu die neueste Literatur bei DOLEŽAL & TSCHERMAK-WOESS), schematisch die zu erwartende Menge des Chromatins (oder der Desoxyribose-Nucleinsäure oder die Chromosomenzahl) in Rechnung, so ergibt sich, daß bei den Diatomeen, die zwei Gameten bilden, eine

andere Beziehung zum Protoplasten als bei jenen mit einem Gameten besteht. Im ersten Fall liegt in den Gameten ein haploider Kern in einer Tochterzelle, die, was den Protoplasten anlangt, einer vegetativen, also diploiden Tochterzelle zu entsprechen scheint; zu ihr würden eigentlich *zwei* haploide Kerne (oder ein diploider Kern) gehören — was bei *Navicula*-Arten auch vorübergehend realisiert ist; bei Diatomeen mit einem Gameten, wie *Cocconeis*, liegt ein haploider Kern in einem ungeteilten, hinsichtlich des Plasmas nahezu völlig prophasischen Protoplasten. Ein entsprechendes „Nichtzusammenpassen" ergibt sich für die Zygoten. Da in Wirklichkeit zweifellos die richtige Abstimmung von Kern und Plasma gegeben ist, muß der Ansatz solcher Überlegungen unrichtig sein; d. h. es herrscht zu Beginn der Meiose — trotz dem gegenteiligen morphologischen Anschein — gar kein mit einer vegetativen Prophase identischer Zustand, und daher entsprechen die Gametenprotoplasten bei Bildung von zwei Gameten auch nicht denen vegetativer Tochterzellen. Daß dem so ist, zeigt indirekt das Verhalten der zwei beobachteten Azygoten (S. 362), falls die Deutung als solche zutrifft (es ist aber kaum eine andere denkbar): hier erfuhr in einer vor der *Meiose* stehenden Mutterzelle — kenntlich an der Kopulationsgallerte — ein diploider Kern eine *Mitose* (statt einer Meiose), es war aber *daher* nur *ein* Tochterkern weiter entwicklungsfähig; dieser entspricht dem Fusionskern, der bei normalem Ablauf entstanden wäre. Es ist also der Protoplast zu Beginn einer Meiose offenbar nicht mit einer vegetativen Prophase vergleichbar; denn dann hätten sich beide Tochterkerne entwickeln können. In die gleiche Richtung deutet die bei *Eunotia arcus* näher untersuchte Erscheinung (Geitler 1951b, S. 298, 306), daß in der Regel in die Kopulation Partner eintreten, die, im Gegensatz zu vegetativen prophasischen Zellen, das fehlende 4. Gürtelband der Hypotheka (jüngere, übergriffene Theka) *nicht* ergänzt haben[1].

Die *zweitgenannte* Auffassung ist durch Fälle differentieller Cytokinesen nach der I. meiotischen Teilung bei Diatomeen, die nur einen Gameten bilden (z. B. *Cocconeis*, *Eunotia*, Geitler 1951b), belegbar: hier gelangt der zugrundegehende Interkinesekern nachweisbar in physiologisch minderwertiges Plasma. Im Fall von *Cymbella aspera* lassen sich aber keine Anhaltspunkte für Verschiedenheiten in der Plasmabrücke, in der sich die II. meiotische Teilung abspielt, gewinnen. Man könnte zunächst an eine Wirkung der Verschiedenheit denken, die durch die schiefe Lage der Plasmabrücke und die randnähere oder -fernere Lage der Tochterkerne gegeben wäre (Abb. 3d). Eine solche

[1] Bei *Cymbella aspera* sind die Gürtel schon in der ruhenden Zelle an Epi- und Hypotheka gleich ausgebildet. Ob sie vielleicht zu Beginn der Meiose weniger als zu Beginn der somatischen Mitose auseinanderrücken, konnte nicht festgestellt werden, da somatische Prophasen nicht beobachtet wurden; nach dem Aussehen früher Telophasen kann der Unterschied zumindest nicht groß sein.

Lagebeziehung besteht aber nicht, die Asymmetrie verschwindet in der Interkinese (Abb. 3f) und die pyknotischen Kerne liegen bald gleichsinnig (Abb. 4b), bald gegensinnig (Abb. 4c) in einer Ebene; selten stehen die Spindeln auch windschief und überhaupt beliebig. Eine Auszählung von Stadien in und unmittelbar nach der II. Telophase ergab das Verhältnis von 16 gleichsinnig zu 20 gegensinnig zu 9 regellos. In diesen Verhältniszahlen drückt sich nur die Tendenz zur Einebnung der Spindellage aus (36:9), während sich Gleich- und Gegensinnigkeit offenbar zufallsgemäß verhalten. Dies alles spricht gegen eine differentielle plasmatische Steuerung. Damit sind zwar nur topographische Gesichtspunkte behandelt; es ist aber danach fast ausgeschlossen, daß sich in der Plasmabrücke etwa zellphysiologisch nachweisbare Unterschiede auffinden lassen könnten und daß diese, selbst wenn vorhanden, so regellos schwanken würden. Im übrigen erscheint die Auffassung besonders schwer anwendbar auf Fälle späten Zugrundegehens in der Zygote anderer Arten, da die Kerne dann an ganz beliebigen Orten in der Zelle liegen.

Die drittgenannte Auffassung stellt eine Denkmöglichkeit dar, ist aber rein hypothetischer Natur, da cytologisch und genetisch nicht unterbaut. Daß bei Diatomeen Chiasmen vorkommen, ließe sich aus dem Aussehen der Chromosomentetraden erwarten. Eine wesentliche Schwierigkeit liegt aber darin, daß die Deutung auf nichtautomiktische Arten, also auf das normale Verhalten, ohne wesentliche und unwahrscheinliche Zusatz-Hypothesen nicht anwendbar ist. Denn im Fall der Bildung von zwei Gameten je Mutterzelle müßten in einem Paar die Gameten AB bzw. ab gewissermaßen in gegenseitigem Einverständnis *so* angeordnet liegen, daß die nebeneinanderliegenden sich immer zur Zygote ABab ergänzen. Tatsächlich erfolgt die Kopulation streng geregelt und ausschließlich zwischen nebeneinanderliegenden Gameten. Bei der zu erwartenden zufälligen Lage der Gameten Ab und ab müßten 50% der Paare keine Kopulation durchführen können und absterben, was aber nicht zutrifft. Die Herstellung der richtigen Gametenanordnung ist aber nicht nur eine unbewiesene, sondern auch eine schwer vorstellbare Hilfsannahme.

Ganz die gleiche Schwierigkeit ergibt sich übrigens für die Frage der *Geschlechtsbestimmung* nach der ersten Alternative (S. 359): Bildet jede Mutterzelle bei allogamen Arten einen männlichen und einen weiblichen Gameten — gleichgültig, ob auf geno- oder phänotypischer Grundlage —, so müssen diese in einem Paar „richtig" zueinander liegen, wenn die Kopulation zustande kommen soll; worin ein derartiger Mechanismus bestehen sollte, ist kaum einzusehen.

Die Vorstellung genetisch-chromosomaler Ursachen für das Pyknotischwerden der Gonenkerne stößt auch bei den Diatomeen mit nur

einem Gameten je Mutterzelle auf kaum überwindbare Schwierigkeiten. Hier müßten bei der inäqualen Cytokinese nach der I. meiotischen Teilung *in einem Paar übereinstimmend* die später zusammenpassenden Kerne erhaltenbleiben. Für die automiktischen Arten allein einen chromosomalen Mechanismus anzunehmen, für die anderen aber nicht, wäre im übrigen zumindest denkunökonomisch.

Eine sichere Entscheidung zwischen den drei Auffassungen ist bei dem derzeitigen Stand der Kenntnisse nicht möglich. Ein chromosomaler Mechanismus scheidet aber wohl aus mehr als einem Grund aus. Am wahrscheinlichsten ist die erste Auffassung, die vielleicht auch allgemeine Gültigkeit für andere Fälle des Ausfalls von Gonenkernen beanspruchen kann. Möglicherweise kann sie sich auf eine noch undurchsichtige Weise mit Differenzen im Plasma kombinieren. Wie eigenartig die Verhältnisse oft liegen, zeigt v. Stosch in seinen grundlegenden Untersuchungen der Gametogenese zentrischer Diatomeen: Bei der Eibildung von *Biddulphia rhombus* macht der meiotische Interkinesekern auch in dem kleinen, defekten Richtungskörper die II. Mitose derart durch, daß — übrigens ohne jeden funktionellen Sinn — ein rekonstruierter und ein pyknotischer Kern entstehen (S. 344, Abb. 29). Auch in dem physiologisch minderwertigen, kleinen Restprotoplasten von *Eunotia* spielt sich, allerdings nicht obligat, die II. Teilung in der gleichen Weise ab (Geitler 1951b, S. 312, Abb. 9, 10).

Was die Frage der Geschlechtsbestimmung anlangt, so ergibt sich unzweifelhaft, daß bei *Cymbella aspera* — wie bei dem pädogamen *Gomphonema constrictum* — zwei Tochtergameten mit zwei Enkelkernen verschiedengeschlechtig sind. Das gleiche gilt für die Kerne bei der autogamen *Denticula tenuis*. Die Geschlechtsbestimmung erfolgt also sicher während der Meiose; sie muß deshalb allerdings nicht genotypisch sein. Eine einfache Übertragung auf die Verhältnisse bei allogamen Arten ist jedoch nicht statthaft, wenn das Verhalten von *Cymbella aspera* und *Gomphonema constrictum* auch unzweideutig zeigt, daß Verschiedengeschlechtigkeit der beiden Gameten einer Mutterzelle *möglich* ist.

Von Interesse wäre die Feststellung, wie die Kopulation im Fall der ausnahmsweisen Paarung der Mutterzellen bei *Cymbella aspera* erfolgt. Sollte die Kopulation auch dann regelmäßig pädogam ablaufen, so würde dies ein gewichtiges Indizium dafür bilden, daß im Fall der gewöhnlichen allogamen Kopulation von Wander- und Ruhegameten anderer Arten die Gameten einer Mutterzelle *nicht* verschiedengeschlechtig determiniert sind. Sollten aber die Ausnahmepaare von *Cymbella aspera* sich allogam verhalten, so würde sich daraus wenig schließen lassen: denn es kann mit der Umstimmung zur Paarung auch eine Umlegung der Geschlechtsbestimmung auf die Diplophase eingetreten sein. Im Fall von *Denticula*

tenuis verhält es sich tatsächlich so, daß mit der Paarung auch die Autogamie aufgehoben ist (vgl. die ausführliche Erörterung 1953); es bleibt bei *Denticula* allerdings fraglich, ob es sich um die gleiche Rasse handelt und ob nicht doch, was fast wahrscheinlicher ist, verschiedene Rassen vorliegen, so daß ein unmittelbarer Vergleich gar nicht möglich ist.

Zusammenfassung

Cymbella aspera bildet in isolierten Mutterzellen zwei Gameten in der gleichen Weise wie nächstverwandte Arten in Kopulationspaaren. Die Gameten kopulieren pädogam — es handelt sich um Tochterprotoplasten mit Enkelkernen —, sie sind also verschiedengeschlechtig. Aus einer Mutterzelle entsteht eine Zygote bzw. Auxospore.

Als sehr seltene Ausnahme erfolgt Paarung der Mutterzellen; mit welchem Erfolg, konnte nicht festgestellt werden, da nur Prophasen beobachtet wurden. Ebenfalls nur ausnahmsweise kommt Bildung von Azygoten unter Ablauf einer Pseudomeiose vor.

Die Gründe für und gegen die Verallgemeinerung des Verhaltens auf allogame Arten werden besprochen, ohne daß sich zwingende Schlüsse ergeben.

Für die Beantwortung der Frage nach den Ursachen des Zugrundegehens je eines Gonenkerns in jedem Gameten lassen sich bestimmte Gesichtspunkte gewinnen. Das Pyknotischwerden je eines Tochterkerns bei den Mitosen, die anläßlich der Bildung der Erstlingsschalen ablaufen, läßt sich daraus erklären, daß sich der Protoplast nicht in einem prophasischen Zustand befindet.

Die Zentralspindel der I. meiotischen Teilung besitzt aus räumlich-mechanischen Gründen keinen kreisrunden, sondern einen flach elliptischen Querschnitt. Die Tochterchromosomengruppen in der I. Anaphase erleiden aus den gleichen Gründen charakteristische Verschiebungen.

Literatur

BELAR, K.: Der Formwechsel der Protistenkerne. Erg. Zool. **6** (1926). — DOLEŽAL, RUTH, u. ELISABETH TSCHERMAK-WOESS: Verhalten von Eu- und Heterochromatin und interphasisches Kernwachstum bei Rhoeo discolor; Vergleich von Mitose und Endomitose. Österr. bot. Z. **102**, 158 (1955). — GEITLER, L.: Der Formwechsel der pennaten Diatomeen. Jena 1932. — Gameten- und Auxosporenbildung von Synedra ulna. Planta (Berl.) **30**, 551 (1939). — Die Auxosporenbildung von Nitzschia sigmoidea und die Geschlechtsbestimmung der Diatomeen. Portugal. Acta Biol., Ser. A, Goldschmidt-Bd. **1949**, 79. — Der Bau des Zellkerns von Navicula radiosa und verwandten Arten und die präanaphasische Trennung von Tochtercentromeren. Österr. bot. Z. **98**, 206 (1951a). — Kopulation und Formwechsel von Eunotia arcus. Österr. bot. Z. **98**, 292 (1951b). — Oogamie, Mitose, Meiose und metagame Teilung bei der zentrischen Diatomee Cyclotella. Österr. bot. Z. **99**, 506 (1952a). — Untersuchungen über Kopulation und Auxosporenbildung pennater Diatomeen. I. Automixis bei Gomphonema constrictum var.

capitata. Österr. bot. Z. **99**, 378 (1952b). — II. Wander- und Ruhegameten bei Amphipleura pellucida. Österr. bot. Z. **99**, 385 (1952c). — III. Gleichartigkeit der Gonenkerne und Verhalten des Heterochromatins bei Navicula radiosa. Österr. bot. Z. **99**, 469 (1952d). — IV. Vierkernige Zygoten bei Navicula cryptocephala var. veneta fa. Österr. bot. Z. **99**, 598 (1952e). — Allogamie und Autogamie bei der Diatomee Denticula tenuis und die Geschlechtsbestimmung der Diatomeen. Österr. bot. Z. **100**, 331 (1953). — Lebendbeobachtung der Gametenfusion bei Cymbella. Österr. bot. Z. **101**, 74 (1954). — GEITLER, L., u. B. MACK: Die Achsenlagen der Auxosporen und Erstlingszellen bei der Diatomee Cymbella. Österr. bot. Z. **100**, 261 (1953). — HARTMANN, MAX: Allgemeine Biologie, 4. Aufl. Stuttgart 1953. — Sexualitätsprobleme bei Algen, Pilzen und Protozoen. Biol. Zbl. **74**, 311 (1955). — HUSTEDT, F.: Bacillariophyta (Diatomeae). In A. PASCHERS Süßwasser-Flora, Heft 10, Jena 1930. — LAUTERBORN, R.: Untersuchungen über Bau, Kernteilungen und Bewegung der Diatomeen. Leipzig 1896. — STOSCH, H. A. v.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. I. Geschlechtsreifung, Befruchtung und Auxosporenbildung einiger grundbewohnender Biddulphiaceen der Nordsee. Arch. Mikrobiol. **23**, 327 (1956).

Prof. Dr. L. GEITLER, Wien (Österr.), Botanisches Institut der Universität

Planta, Bd. 47, S. 374—400 (1956)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

STUDIEN ÜBER BILDUNG UND ABBAU VON TOMATIN IN DER TOMATENPFLANZE*

Von

HENRICH SANDER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. März 1956)

I. Einleitung

Neuerdings haben die Glykoalkaloide aus *Solanum*- und *Lycopersicon*-Arten starkes Interesse auf sich gezogen. Seit über 100 Jahren ist bereits ihr markantester Vertreter, das Solanin, bekannt, fand jedoch keine praktische Verwendung.

1945 berichtete IRVING u. Mitarb. erstmalig über antibiotische Eigenschaften von Tomatenblattextrakten. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnte ein neues Glykoalkaloid, das Tomatin, rein dargestellt werden (FONTAINE u. Mitarb. 1948). Es erwies sich besonders gegen Pilze wirksam, die bakteriostatische Wirkung dagegen ist gering. KUHN u. GAUHE (1947 u. 1950) erkannten Tomatin und Demissin, ein Glykoalkaloid aus *Solanum demissum*, als Resistenzfaktoren gegen den Kartoffelkäfer. In zahlreichen Arbeiten, die SCHREIBER (1954) zusammengefaßt hat, wurde seither über die züchterischen Möglichkeiten und Erfolge in dieser Richtung berichtet. Schließlich gelang SATO und Mitarb. (1951) der Abbau des Tomatidins, der zuckerfreien Base des Tomatins, zum Δ16-Allo-pregnen-3β-ol-20-on und damit richteten sie das Augenmerk auf ein neues Ausgangsmaterial für Hormonsynthesen.

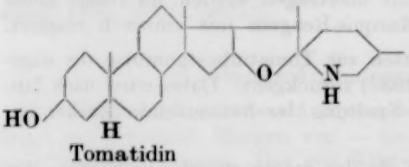
So kam es, daß in jüngster Zeit von verschiedenen Seiten die Chemie und Biologie dieser Stoffgruppe bearbeitet wurde. Eine Zusammenstellung der Literatur gibt SCHREIBER (1954).

Über die Chemie des Tomatins berichteten PRELOG u. JEGER (1953) sowie FERNHOLZ (1954), so daß es nicht notwendig ist, näher darauf einzugehen.

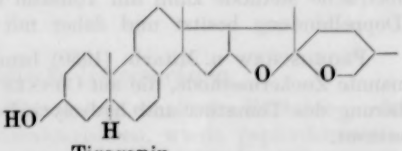
Kristallinem Tomatin kommt die Formel $C_{50}H_{83}O_{21}N$ zu. Die Säurehydrolyse ergibt das Aglykon Tomatidin $C_{27}H_{45}O_2N$ und ein Zuckergemisch, das aus 1 Mol d-Xylose, 2 Mol d-Glucose und 1 Mol d-Galaktose besteht. Die von KUHN u. LÖW (1952) vorgeschlagene Formel zeigt, daß Tomatidin nahe Beziehungen zu den Sapogeninen aufweist. So

* Teil I einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin in gekürzter Fassung. (Teil II erscheint im Archiv der Pharmazie.)

sind die Sapogenine Smilagenin und Tigogenin aufs engste mit Tomatidin verwandt, und sie unterscheiden sich bis auf die sterische Konfiguration lediglich durch Ersatz des O-Atoms im Ring F durch eine NH-Gruppe beim Tomatidin.



Tomatidin



Tigogenin

Auf Grund ihres Stickstoffgehaltes werden aber die Steroide aus *Solanum*- und *Lycopersicon*-Arten zu den Alkaloiden gerechnet. Damit entsteht der Eindruck, als ob sie mit den anderen Alkaloiden aus Solanaceen, besonders den Basen vom Nicotin- und Hyoscyamin-Typ, Gemeinsamkeiten hätten. Aus Gründen ihrer chemischen Konstitution und ihres physiologischen Verhaltens ist aber mit keinen biogenetischen Zusammenhängen zu rechnen, und man wird die Steroidalkaloide vielmehr im Zusammenhang mit den Steroidsapogeninen betrachten müssen.

Die Ähnlichkeit im chemischen Aufbau erstreckt sich nicht nur auf das Aglykon, auch in ihrem Zuckeranteil stimmen Glykoalkaloide und Steroidsaponine weitgehend überein. Vorwiegend werden Glucose, Galaktose, Rhamnose und Xylose gefunden. Außerdem sind die hämolytische Wirksamkeit und ihre Aufhebung durch Cholesterin sowie das starke Schaumbildungsvermögen beiden Gruppen gemeinsam.

Biogenetische Zusammenhänge zwischen den Sapogeninen und den Steroidalkaloiden werden von Tschesche u. Korte (1952), Tschesche (1954) und Woker (1953) diskutiert. In dieser Hinsicht ist es von großem Interesse, daß neben Solasodin eine kleine Menge Diosgenin aus den Früchten von *Solanum xanthocarpum* isoliert werden konnte (Sato u. Latham 1953). In der gleichen Art wurde auch das Sterin Carpesterin gefunden (Gupta u. Dutt 1938). Es fällt auf, daß Steroidsaponine und Glykoalkaloide vorwiegend in den reproduktiven Organen der Pflanzen lokalisiert sind. Marker u. Lopez (1947) untersuchten die Veränderungen in der Beschaffenheit der Sapogenine während des Entwicklungabblaufes einiger mexikanischer Liliifloren und stellten dabei fest, daß die jungen Sprosse komplexe Mischungen enthalten. Nach dem Übergang in die reproduktive Phase erscheinen weniger und sauerstoffärmere Aglykone.

Im ganzen gesehen, liegen über den Steroidstoffwechsel bei Pflanzen nur wenige Untersuchungen vor. Ziel folgender Versuche war es nun, Anhaltspunkte für die Aufklärung der Bildung und des Abbaus von Tomatin in der Tomatenpflanze zu gewinnen.

II. Methode und Material

1. Bestimmung des Tomatins

Für die quantitative Bestimmung des Tomatins sind in der Literatur nur spärliche Angaben zu finden. Die für Solaninbestimmungen häufig angewandte kolorimetrische Methode kann auf Tomatin nicht übertragen werden, da dieses keine Doppelbindung besitzt und daher mit Marquis-Reagens nur schwach reagiert.

PROKOSCHEW u. Mitarb. (1950) benutzten zur Tomatinbestimmung die sogenannte Zuckermethode, die auf CONNER (1937) zurückgeht. Dabei wird nach Isolierung des Tomatins und hydrolytischer Spaltung der freiwerdende Zucker bestimmt.

Für die folgenden Untersuchungen wurde das gravimetrische Verfahren, das in Anlehnung an KUHN u. LÖW (1947) KERN (1952) angibt, mit geringfügigen Modifikationen benutzt.

Zur Aufarbeitung gelangte bei 100° C im Thermostaten getrocknetes, gemahlenes und abermals bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Material. Die Extraktion erfolgte durch Aufkochen mit je 100 ml 2%iger Essigsäure pro 10 g trockenen Pulvers und anschließendes einstündiges Digerieren auf dem warmen Wasserbad. Nach Abnutschen und Waschen mit 25 ml des gleichen Lösungsmittels wurde dieser Vorgang noch 2mal wiederholt. Alle Essigsäureextrakte wurden zusammengegeben, mit Ammoniak auf p_H 10—11 eingestellt und 30 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt, anschließend 12 Stunden stehen gelassen. Von dem gut abgesetzten Niederschlag (Rohextrakt) wurde ein Großteil der überstehenden Flüssigkeit abdekantiert, der Rest abfiltriert, getrocknet, fein verrieben und zusammen mit dem Filter in je 100 ml Methanol pro g Rohextrakt 4mal eine Stunde am Rückflußkühler gekocht. Die Methanolextrakte wurden filtriert, vereinigt und zur Trockne auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wurde mit wenigen ml 2%iger Essigsäure mehrmals ausgekocht, filtriert, mit Ammoniak gefällt wie das erste Mal, und der Niederschlag auf ein Glasfiltertiegel G 3 gesammelt, gewaschen, getrocknet und gewogen.

Das so erhaltene Produkt ist noch keineswegs rein. Es zeigte sich, daß Farbstoffe, vor allem grüne Blattpigmente, sehr stark an das ausgefällte Alkaloid adsorbiert werden und daher auffällig als Verunreinigung in Erscheinung treten, obgleich sie gewichtsmäßig nicht viel ausmachen. Wie die für Saponine ziemlich spezifische Fällung mit Cholesterin zeigt, können die Verunreinigungen höchstens 10% betragen. Da aber stets nach dem gleichen Verfahren gearbeitet wurde und es in den folgenden Versuchen lediglich auf den relativen Gehalt der einzelnen Pflanzen bzw. Organe ankam, kann diese Ungenauigkeit in Kauf genommen werden, zumal, wie Vergleichsuntersuchungen (s. Dissertation) zeigen, die Methode gut reproduzierbare Werte liefert.

Es ist aber darauf zu achten, daß der erste Essigsäureauszug nach NH_3-Zusatz genügend Zeit hat, sich quantitativ abzusetzen. 30 Minuten, wie sie KERN angibt, sind nach den Vergleichsuntersuchungen zu wenig. Die Essigsäureextraktion ist vollständig, denn das ausgekochte und getrocknete Pulver zeigte, in Blutgelatine gelegt, keine bis ganz minimale Hämolyse. Eine Hydrolyse des Glykoalkaloids und dadurch bedingte zu geringe Ausbeute finden in 2%iger Essigsäure nicht statt. Auch nachdem reines Tomatin vier Tage in 2%iger Essigsäure gestanden hatte, war nach seiner Ausfällung im Filtrat mit Fehlingscher Lösung kein Zucker nachzuweisen. Somit erscheint das beschriebene Verfahren für den Zweck der Versuche geeignet. Für genauere, spezielle Untersuchungen müssen noch exaktere, vor allem aber auch schneller durchzuführende Methoden geschaffen werden.

Zur Identifizierung des Tomatins wurde das Produkt aus Methanol umkristallisiert und durch vierstündiges Kochen in n-HCl hydrolysiert. In der Zuckerlösung konnten papierchromatographisch Glucose, Galaktose und Xylose sowie die Abwesenheit von Rhamnose nachgewiesen werden. Nach mehrfacher Umkristallisation aus Methanol ergab das Tomatidin einen Schmelzpunkt von 202° C (KUHN u. LÖW, 1952, 202—203° C), und Tomatidinhydrochlorid 265° C (BRINK u. FOLKERS, 1951, 275—280° C).

2. *Papierchromatographische Untersuchung*

Um die bei den einzelnen Analysen der Pflanzenteile erhaltenen Produkte — oft lagen nur minimale Mengen vor — zu charakterisieren, wurde papierchromatographisch vorgegangen. Das von KUHN u. LÖW (1954 u. 1955) für Solanin und Solasonin ausgearbeitete Verfahren läßt sich auch auf Tomatin übertragen. Die mit Phosphormolybdat erhaltenen Flecke zeigen gegenüber Solanin einen mehr blaugrünen Farbton. Man kann auch die Streifen nach der Methode von NEHER u. WETTSTEIN (1951) durch 15%ige Phosphorsäure ziehen und bei 90° C 30 min trocknen. Es erscheinen dann bei UV-Licht lila Flecke. R_F = 0,17—0,20. (Das Papier Schleicher und Schüll 2043b wurde vorher 12 Stunden mit dem Entwicklergemisch gesättigt.)

Tomatidin, unter den gleichen Bedingungen chromatographiert, zeigt einen R_F-Wert von etwa 0,87 und läßt sich daher in einem Gemisch gut auffinden.

Es lag nun die Vermutung nahe, daß Tomatin ebenso wie „Solanin" ein Gemisch mehrerer Glykoside sei (KUHN u. LÖW 1954). Mit der gleichen Methode, mit der die Auftrennung des „Solanins" gelang, konnte aber das aus Blättern gewonnene Tomatin nicht in mehrere Fraktionen zerlegt werden. Vielleicht reichte die Empfindlichkeit der Reaktion zum Sichtbarmachen der Flecken nicht aus. Tomatidin reagiert infolge des Fehlens einer Doppelbindung im allgemeinen schwerer als Solanidin. Immerhin wurden bei einigen Proben, auf die jeweils hingewiesen wird, ganz schwache zusätzliche Flecke beobachtet, die auf das Vorhandensein weiterer Glykoside hindeuten. Eine einwandfreie Identifizierung war aus Materialmangel in keinem Falle möglich. Es sei aber ausdrücklich betont, daß die als „Tomatin" bei den folgenden physiologischen Versuchen angesprochene Substanz unter Umständen ein „Gesamttomatin" ist, das sich aus mehreren Glykosiden und evtl. der freien Base zusammensetzt. Die Gewinnung beruhte stets auf dem beschriebenen Verfahren, das den Vorteil hat, alle basischen Glykoside und freien Basen zu erfassen, auf die es im Rahmen der Fragestellung ankam. Daher wurde auch auf weitergehende Reinigung verzichtet, um nicht bei wiederholtem Umkristallisieren zu große Verluste in Kauf nehmen zu müssen.

Mehrfach aus Methanol umkristallisiertes, weißes Tomatin zeigte bei der papierchromatographischen Untersuchung einen einheitlichen Fleck, der den gleichen R_F-Wert gab wie zum Vergleich mitgelaufenes authentisches Tomatin[1].

3. *Verteilung des Tomatins im Sproß*

Bevor mit den physiologisch-chemischen Versuchen begonnen werden konnte, mußten zunächst die im hiesigen Institut vorhandenen Sorten auf ihren Tomatingehalt geprüft werden. Aus der Literatur (KUHN u. Mitarb. 1950; KERN 1952; PROKOSCHEW u. Mitarb. 1952a)

[1] Für die Überlassung von Tomatin an Herrn Prof. DRAWERT sei auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. RICHARD KUHN aufrichtigst gedankt.

war zu entnehmen, daß die in den Tomatenblättern gefundenen Alkaloidmengen erheblich schwanken. Übereinstimmend wird von allen Autoren festgestellt, daß in sämtlichen bisher untersuchten Vertretern der Gattung *Lycopersicon* Tomatin, und zwar nur Tomatin gefunden wird. In den Kulturformen ist der Gehalt im allgemeinen niedriger als in den Wildformen.

Die Prozentgehalte der im Pflanzenphysiologischen Institut in Berlin-Dahlem vorhandenen Sorten und Arten wurden im August-September 1952 geprüft. Bezogen auf das Trockengewicht ergaben sich Werte, die bei Blättern und Triebspitzen zwischen 2,5 und 0,8% lagen, Stengel enthielten weniger, ca. 0,7%, noch weniger die unreifen Früchte, etwa 0,4%. Praktisch alkaloidfrei sind die reifen Früchte, während andrerseits die stärkste Tomatinansammlung in den Blüten und ganz jungen Früchten zu verzeichnen ist.

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine alkaloidreiche Rasse von *Lycopersicon pimpinellifolium* ausgewählt; sie wird als L 3 bezeichnet.

Bei der Anzucht aus Samen im folgenden Jahr fielen drei Pflanzen durch besonders kräftigen Wuchs und stärkere Behaarung auf. Sie wurden mit K 1 bis K 3 bezeichnet und durch Stecklinge vermehrt, um für die späteren Untersuchungen genetisch einheitliches Material zu haben. Drei Exemplare, die dem normalen Typus von L 3 entsprachen, wurden mit K 4 bis K 6 kenntlich gemacht und ebenfalls vegetativ vermehrt. Wie sich durch Selbstung der von K 3 abgeleiteten Individuen später herausstellte, handelte es sich um einen natürlich aufgetretenen Bastard zwischen *L. pimpinellifolium* und *L. esculentum* var. *scopigerum* Lehmann, „Blondköpfchen".

4. Tomatingehalt der Wurzel

Nach KERN (1952) soll in den Wurzeln nur so wenig Tomatin zu finden sein, daß ihm eine genauere Bestimmung oft nicht möglich war. Diese Angabe konnte bestätigt werden. Vor allem die dicken Hauptwurzeln enthielten nur wenig ($\sim$ 0,07% des Trockengewichts). Mehr war in den Faserwurzeln zu finden, nämlich bis zu 0,39% bezogen auf das Trockengewicht. Wie sich bei hämolytischen Versuchen mit Blutgelatine zeigte, ist das Saponin vorwiegend in den Wurzelspitzen lokalisiert. Da diese bei noch so vorsichtigem Ausgraben verloren gehen, sind derartige Analysen stets mit einem großen Fehler behaftet. Überdies hat das Wurzelsystem auf die Alkaloidführung des Sprosses, worauf noch zurückzukommen sein wird, höchstens einen sehr geringen Einfluß und daher blieb in den folgenden Untersuchungen der Tomatingehalt der Wurzel in den meisten Fällen unberücksichtigt. Vollständig können die unterirdischen Teile der Pflanze nur bei Wasserkultur gewonnen werden, und in diesem Falle ergab sich auch, daß das Gesamtwurzelsystem 0,47% Alkaloid bezogen auf das Trockengewicht enthielt, während in den blühenden Sprossen 2,4% gefunden wurde, was dem Wert der entsprechenden Freilandpflanzen entsprach.

Es war nun von Interesse, festzustellen, ob in den Wurzeln ein Gemisch von Tomatin und Tomatidin vorliegt. Die hämolytischen Befunde an Wurzelspitzen deuten auf ein Saponin, wohl Tomatin, während nach Brink u. Folkers (1951) getrocknete Wurzeln der Sorte „Rutger" 0,01% Tomatidin enthalten sollen.

Die minimalen, bei den einzelnen Bestimmungen erhaltenen Niederschläge wurden gesammelt und eine Probe nach dem beschriebenen Verfahren chromatographiert. Zum Vergleich mitgelaufenes reines Tomatin gab den gleichen Fleck wie das aus Wurzeln isolierte, zusätzlich konnte bei letztem aber noch ein ganz schwach fluorescierender Fleck an der Lösungsmittelfront festgestellt werden, der, wie eine Vergleichsprobe zeigte, wahrscheinlich auf Tomatidin zurückzuführen ist. Die Möglichkeit, daß Spuren von Tomatidin während der Aufarbeitung entstanden sind, ist unwahrscheinlich, da bei anderen Tomatinproben niemals dieser zusätzliche Fleck beobachtet werden konnte. Es muß also damit gerechnet werden, daß in den Wurzeln neben dem Glykoalkaloid in minimalen Mengen auch noch die freie Base vorkommt.

III. Bildungsort

1. Pfropfversuche

Um Aufschluß über den Bildungsort eines Alkaloids zu erhalten, wurde in neuerer Zeit die Methode der reziproken Pfropfung einer alkaloidführenden Art mit einer alkaloidfreien mit Erfolg angewendet. Im einzelnen braucht auf diese Methode nicht eingegangen zu werden, denn sie ist wiederholt zusammenfassend dargestellt worden (Dawson 1948; James 1950; Mothes 1952 u. 1955). Mit diesem Verfahren und der Kultur isolierter Organe wurde nachgewiesen, daß der Hauptbildungsort für Nicotin, Hyoscyamin und verwandte Alkaloide die Wurzel ist.

Kern sprach nun die Vermutung aus, daß auch die Vertreter der dritten Gruppe der Solanaceen-Basen, also die Glykoalkaloide, mindestens teilweise in der Wurzel gebildet und in den Blättern angereichert würden. Bei dem an sich häufig untersuchten Alkaloid der Kartoffel, dem Solanin, sind, soweit bekannt, reziproke Pfropfungen, mit dem Ziel, die Biogenese dieses Stoffes aufzuklären, noch nicht durchgeführt worden.

Die Arbeit von Prokoschew u. Mitarb. (1952b), wurde erst nach Abschluß der Versuche bekannt. Mit einer anderen analytischen Methode kommen die russischen Autoren zu den gleichen Ergebnissen, wie sie im folgenden dargestellt werden, und somit müssen die Befunde als weitgehend gesichert gelten. Ihren Folgerungen kann jedoch nicht zugestimmt werden (s. S. 382).

Bei Vorversuchen im Jahre 1952 mit der Pfropfung tomatinreicher Tomatensorten auf tomatinarme und umgekehrt, hatte sich bereits ergeben, daß die Reiser ihre rassische Eigenart bezüglich des Tomatingehaltes beibehielten. Das gleiche Ergebnis zeigten auch die Versuche des folgenden Jahres mit der reziproken Pfropfung Tomate/Tabak. Die auf Tabakwurzel entwickelten Tomatenreiser waren gegenüber den Kontrollen in ihrem Alkaloidgehalt unverändert.

Im Frühjahr 1954 wurden schließlich Pfropfungen mit vier verschiedenen, nach Angaben der Literatur (SEKA 1933) steroidalkaloidfreien Partnern durchgeführt, um die Frage zu klären, ob durch andere Unterlagen nicht doch eine Veränderung in der Tomatinführung erzielt werden kann und ob verschiedene Tomatenreiser auf ein und derselben fremden Art als Unterlage in ihrem Alkaloidgehalt beeinflußt werden.

Folgende reziproke Pfropfungen wurden hergestellt:

a) *Lycopersicon esculentum/Nicotiana tabacum*
b) *Lycopersicon pimpinellifolium/Nicotiana tabacum*
c) *Lycopersicon pimpinellifolium/Datura stramonium*
d) *Lycopersicon pimpinellifolium/Petunia nyctaginiflora*
e) *Lycopersicon pimpinellifolium/Nicandra physaloides*

Da die Versuche keine grundsätzlich neuen Ergebnisse lieferten, sollen sie hier nicht im einzelnen dargestellt werden. Versuchsbedingungen und Analysenergebnisse sind ausführlich in der Dissertation niedergelegt.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden: *Die Unterlage hat auf den Tomatingehalt des Sprosses keinen oder doch nur einen sehr geringen Einfluß. Die Höhe des arteigenen Alkaloidspiegels wird auch über einem fremden Wurzelsystem aufrechterhalten und die jahreszeitlichen Schwankungen im Tomatenreis treten genau so in Erscheinung wie in normalen Pflanzen.*

Dieses zeigt sehr deutlich folgender Versuch (Tabelle 1): Pfropfungen von Tomate auf Tabak wurden im Gewächshaus kultiviert (im Winter mit Zusatzlicht) und der Sproß wiederholt zurückgeschnitten und analysiert. Es ergaben sich lediglich jahreszeitliche Schwankungen, aber kein allmähliches Nachlassen der Tomatinproduktion im Tomatenreis. Mit dem Wachstum der Adventivtriebe vermehrte sich auch ihr Glykoalkaloidgehalt und wurde in der arteigenen Höhe beibehalten.

Auffallend ist der hohe Tomatingehalt bei *Lycopersicon esculentum* im Frühjahr, eine Erscheinung, die auch bei ungepfropften Pflanzen beobachtet wurde. In der Zeit vom 12. Februar bis zum 18. März 1955 waren die Achselknospen auf ein Frischgewicht von 45,0 g herangewachsen, dabei hatten sich in den neuen Trieben 83 mg Tomatin angesammelt. Zwischen dem 27. Dezember 1954 und dem 12. Februar 1955 also in den knapp zwei Monaten vorher, waren nur 40 g junge Triebe ge-

bildet worden, mit einem Gehalt von 18,7 mg Tomatin. In den folgenden Monaten war das Wachstum und mit ihm die Tomatinbildung der austreibenden Achselknospen gering, wohl infolge der sich immer stärker bemerkbar machenden Schädigung durch Nicotin.

2. *Wurzelkultur*

Nachdem gezeigt war, daß der Tomatensproß in der Lage ist, unabhängig von der Wurzel Tomatin zu bilden, ergab sich die Frage, ob die Wurzel überhaupt fähig ist, dieses Glykoalkaloid aufzubauen. Zur

Tabelle 1. *Jahreszeitliche Schwankungen des Tomatingehaltes der Pfropfung Tomate auf N. tabacum*

Datum	Nr. der Pfropfung	Beschreibung	Frischgewicht je Sproß g	Trockengewicht je Sproß g	Trockensubstanz %	Tomatingehalt mg	Tomatingehalt Frischgewicht %	Tomatingehalt Trockengewicht %
		Lycopersicon esculentum:						
29. 8. 54	P 8	blühend	102,0	10,07	9,9	97,7	0,10	0,97
25. 9. 54	P 8	fruchtansetzend	68,4	7,87	11,5	66,7	0,10	0,85
25. 9. 54	P 8	fruchtansetzend	86,3	10,6	12,2	74,9	0,09	0,71
27. 12. 54	P 8	Blütenknospen	42,6	3,45	8,1	31,5	0,07	0,32
12. 2. 55	P 8	blühend	35,9	3,11	8,7	18,7	0,05	0,60
18. 3. 55	P 8	blühend	45,0	4,61	10,2	83,1	0,18	1,80
2. 6. 55	P 8	starke Chlorophylldefekte	69,5	11,53	16,6	40,5	0,06	0,35
1. 11. 55	P 8	vegetativ	100,5	8,87	8,8	25,8	0,03	0,29
		Lycopersicon pimpinellifolium:						
9. 9. 54	P 49	blühend+fruchtend	73,1	12,18	16,6	152,3	0,21	1,25
9. 9. 54	P 52	vegetativ	43,0	3,58	8,3	97,2	0,23	2,17
11. 1. 55	P 49	blühend+fruchtend	72,1	9,22	12,8	117,1	0,16	1,27
11. 1. 55	P 52	vegetativ	25,9	2,18	8,4	35,1	0,14	1,61
2. 6. 55	P 52	fruchtend	43,5	8,51	19,6	113,0	0,26	1,33

Klärung des Problems wurden nach dem Verfahren von White (1954) Kulturen isolierter Wurzeln angelegt, statt der Vitaminlösung aber der ursprünglich von White (1934) angegebene Hefeextrakt verwendet.

Auf diese Weise konnten annähernd 5 g trockene Wurzelmasse gewonnen und aufgearbeitet werden. Dabei wurden 15,6 mg (entsprechend 0,32% des Trockengewichtes und 0,02% des Frischgewichtes) einer Substanz erhalten, die wie folgt indentifiziert werden konnte: Ein Teil wurde direkt papierchromatographisch untersucht; er unterschied sich weder in der Fluorescenzfarbe noch im R_F-Wert von authentischem Tomatin. Nach Hydrolyse des Restes gab die papierchromatographische Auftrennung des Filtrates die gleichen R_F-Werte für die Zuckerkomponenten wie ein Hydrolysat reinen Tomatins. Der Schmelzpunkt der

Base konnte aus Materialmangel nicht bestimmt werden, doch deutet die rötliche Fluorescenz eines Fleckes mit dem R_F-Wert 0,86 mit großer Wahrscheinlichkeit auf Tomatidin. Damit ist wohl mit genügender Sicherheit gezeigt, daß die Wurzel imstande ist, auch ohne Hilfe des Sprosses Tomatin zu synthetisieren. Hervorzuheben ist dabei ihre Fähigkeit, Xylose zu bilden, denn in der Nährlösung wurden ihr im Rohrzucker lediglich Glucose und Fructose geboten.

Eine Ausscheidung von Tomatin in die Nährlösung konnte nicht festgestellt werden. Für diese Untersuchung wurden nur die Kulturlösungen aufgearbeitet, in denen ein intensives Wurzelwachstum stattgefunden hatte. So waren z. B. in sechs 300 ml-Kolben nach fünf Wochen 0,01; 0,01; 0,39; 0,44; 0,59 und 2,42 g frische Wurzeln vorhanden, obwohl sie gleichzeitig mit annähernd gleichen Stücken eines Klones beimpft worden waren.

Auf Grund dieser Ergebnisse müssen die Folgerungen, die PROKOSCHEW u. Mitarb. (1952b) aus ihren Versuchen ziehen, revidiert werden. Sie stellen als Resultat ihrer Pfropfversuche fest, „daß die Glykoalkaloide der Solanaceen sich nur in den Blättern (möglicherweise auch in den Stengeln), nicht aber in den Wurzeln der Pflanze bilden" (Übersetzung aus dem Russischen).

Der Versuch mit isolierten Wurzeln zeigt, daß auch diese Glykoalkaloide zu bilden vermögen. Die Analysenergebnisse der russischen Autoren jedoch, die auf einer anderen Bestimmungsmethode beruhen, können in vollem Umfang bestätigt werden. Der erhöhte Glykoalkaloidgehalt im Pfropfreis ist aber keineswegs durch einen „spezifischen Charakter der Unterlage" zu erklären. Die von ihnen beobachteten Gehaltssteigerungen zeigen untereinander beachtliche Schwankungen und sind höchstwahrscheinlich auf das Ausmaß des Fruchtansatzes zurückzuführen, über den keine Angaben gemacht wurden. 4,2% bezogen auf das Trockengewicht sind nichts Außergewöhnliches, wenn die Pflanze keine Früchte trägt. Gerade der Fruchtansatz ist bei gepfropften Exemplaren häufig geringer als bei Normalpflanzen.

Damit können die Versuchsergebnisse dieses Abschnittes wie folgt zusammengefaßt werden: *1. Der Sproß ist als Hauptbildungsstätte für Tomatin anzusehen. 2. Die Wurzel hat ebenfalls die Fähigkeit zur Bildung von Tomatin, doch findet in ihr keine so starke Ansammlung statt. Aus der Wurzel wird wahrscheinlich kein Tomatin in die Nährlösung ausgeschieden. 3. Der Einfluß der Wurzel auf die Tomatinführung des Sprosses ist gering.*

3. Wanderung von Tomatin

Aus den Pfropfversuchen ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine Wanderung von Tomatin in nennenswertem Umfang. Da die

Tomatenwurzel Tomatin bilden kann, bestände an sich auch die Möglichkeit, daß dieses in das gepfropfte Reis abwandert. Eine einwandfreie Identifizierung im Tabakreis gelang jedoch nicht.

Mit diesem Ergebnis stimmt überein, daß im Blutungssaft normaler Pflanzen nicht mit Sicherheit Tomatin nachzuweisen war. Es wurde auf zwei Wegen versucht, Tomatin zu erfassen:

Nach der von KOFLER (1932) angegebenen capillaranalytischen Methode wurde der aus dem Sproßstumpf innerhalb von 48 Stunden austretende Blutungssaft durch einen mit einer Cholesterinschranke imprägnierten Papierstreifen aufgefangen. Nach dem Trocknen wurde der imprägnierte Teil herausgeschnitten und sechs Stunden in Xylol gekocht. Das getrocknete Streifchen wurde sodann mit wenigen ml 2%iger Essigsäure ausgekocht, die Flüssigkeit abdekantiert und mit einigen Tropfen konz. Ammoniak alkalisch gemacht. Es trat eine opalisierende Trübung ein. Nach dem Absitzen wurde die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und der Niederschlag auf einem Objektträger eingedunstet. Unter dem Mikroskop war neben Papierfasern eine amorphe Masse zu erkennen. Ein Teil mit konz. Schwefelsäure betupft, färbte sich nur schwach blaß violett, der andere mit Mandelins Reagens nach einer halben Stunde gelblich-grün. Papierfasern mit den beiden Reagentien versetzt, zeigten keine Farbtöne. Reines Tomatin gibt mit konz. Schwefelsäure eine intensive Violettfärbung, mit Mandelins Reagens wird es allmählich dunkelgrün.

In einem weiteren Versuch wurden insgesamt 55,4 ml Blutungssaft von mehreren Pflanzen aufgefangen. Dazu diente ein oben mit einem Wattebausch verschlossenes Röhrchen, das mit Hilfe eines Gummischlauches über den Sproßstumpf gestülpt wurde. Der Blutungssaft wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand zweimal mit einigen ml 2%iger Essigsäure ausgekocht, filtriert und mit konz. Ammoniak versetzt. Nach dem Trocknen betrug der Niederschlag 24,4 mg. Durch Übergießen mit siedendem Methanol konnte er teilweise von dem Glasfilter gelöst werden. Das eingedampfte Filtrat wurde mit 2 Tropfen Eisessig versetzt und chromatographiert. Dabei zeigten sich keine Flecke, die auf Anwesenheit von Tomatin oder Tomatidin hindeuteten.

Wenn nach diesen Versuchen der Übertritt von Tomatin aus der Wurzel in den Sproß höchstens sehr gering sein kann, falls er überhaupt stattfindet, so scheint doch innerhalb des Sprosses eine stärkere Verschiebung dieses Glykoalkaloids stattzufinden. KERN berichtet z. B., daß in dem aus abgeschnittenen Blättern austretenden Saft eine Konzentration von ungefähr 10^{-4} mol Tomatin zu finden sei. Aus den in Abschnitt V, c mitgeteilten Versuchen ist ebenfalls zu schließen, daß eine beträchtliche Einwanderung in die Früchte stattfinden muß, denn es erfolgt eine stärkere Ansammlung des Glykoalkaloids in den vegetativen Teilen, wenn die generativen entfernt werden.

IV. Änderungen des Tomatingehaltes in der normalen Pflanze

1. Beziehung des Tomatingehaltes der Pflanze zu ihrem Wachstum

Um zunächst einen groben Überblick zu gewinnen, wurde die Veränderung des Tomatinspiegels in der normalen Entwicklung verfolgt.

Hierzu wurden Samen von *L. pimpinellifolium* zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen Januar und Mai 1954 ausgesät. Die Alkaloidanalysen der teils im Gewächshaus, teils im Freiland herangezogenen Pflanzen erfolgten zwischen März und August. Die Exemplare der Freilandpflanzen wurden aus einer Population von 100 Pflanzen ausgewählt und umfassen das größte, das kleinste und zwei mittlere Individuen. Wie aus Abschnitt III, 1, zu ersehen, scheint der Einfluß des Wurzelsystems auf die Tomatinbildung gering zu sein, und daher wurde als Bezugsgröße die absolute Tomatinmenge je Sproß gewählt. Der Gehalt der Wurzel blieb unberücksichtigt. Um pro Analyse stets 2—10 g Trockensubstanz zur Verfügung zu haben, war es notwendig, bei den *jungen* Keimlingen viele zu einer Analyse zusammenzufassen; die *ausgewachsenen* Exemplare besonders der Freilandpflanzen wurden dagegen in mehrere Analysen unterteilt. Mithin sind die Werte für die Sämlinge berechnete Durchschnittszahlen aus bis zu 2000 Exemplaren, die der ausgewachsenen Sprosse dagegen Zusammenfassungen aus mehreren Einzelanalysen. Auf diese Weise konnte bei gleichbleibender Fehlerbreite in den Analysen Pflanzen zwischen 0,015 g und 1730 g Frischgewicht erfaßt werden.

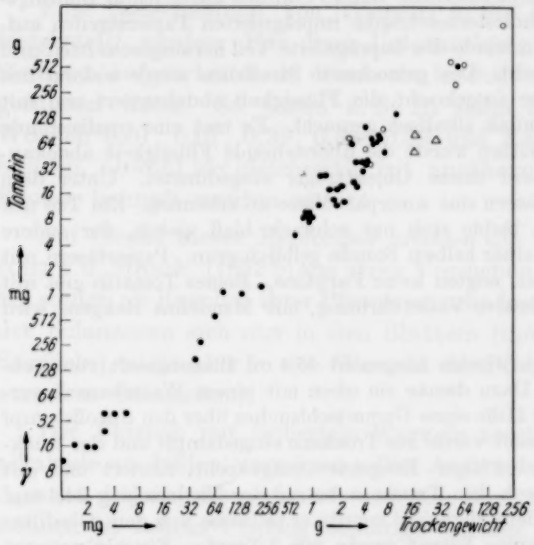


Abb. 1. Beziehung zwischen Tomatinansammlung und Wachstum. Abszisse: Trockengewicht je Sproß. Ordinate: Tomatingehalt je Sproß. Es bedeuten: ● Gewächshauspflanzen, ○ Freilandpflanzen, △ absterbende Freilandpflanzen nach Fruchtansatz

Es zeigte sich deutlich, daß die Vermehrung der absoluten Tomatinmenge mit dem Wachstum des Sprosses Schritt hielt. Als Maß für das Wachstum wird im allgemeinen die Zunahme der Trockensubstanz angesehen (JAMES 1950). Bezieht man die Ergebnisse auf das Trockengewicht, so schwankt der Prozentgehalt an Tomatin bei 55 Analysen nur zwischen 1,3 und 0,70% mit Extremwerten bei 2,40% und 0,42%, bei einer gleichzeitigen Zunahme der lebenden Substanz um das 100000fache. Besser als diese Zahlen zeigt Abb. 1 die Verhältnisse, für die aus Gründen der Übersicht ein quadratischer Maßstab gewählt wurde.

Aus dem Rahmen fallen die im Oktober durchgeführten Analysen von drei im Freiland herangewachsenen Exemplaren (als Dreiecke eingetragen), die reichlich gefruchtet hatten, zu dieser Zeit aber vergilbt und nahezu völlig abgestorben waren. Einzelne reife Früchte begannen bereits am Sproß einzutrocknen. Mit den noch unreifen analysiert, lieferten sie nur Spuren von Tomatin, während die vertrockneten Sprosse

mehr enthielten. Unter Zusammenziehung der isolierten Alkaloidglykoside aus den vegetativen und reproduktiven Organen und Berechnung auf den Gesamtsproß ergab sich ein Gehalt von im Durchschnitt nur 0,30% bezogen auf das Trockengewicht (vegetative Organe für sich durchschnittlich 0,45%).

Man kann das Ergebnis dieser orientierenden Vorversuche dahingehend zusammenfassen, daß in der Tomatenpflanze solange eine Neubildung und Anhäufung von Alkaloidglykosiden stattfindet, als sie sich in intensivem Wachstum befindet. Damit ist nichts über den Umfang der Alkaloidsynthese ausgesagt. Es liegt aber eine positive Bilanz vor,

Tabelle 2. *Verteilung des Tomatins in den einzelnen Sproßorganen*

	Frischgewicht je Organ g	Trockengewicht je Organ g	Trockensubstanz %	Tomatingehalt		
				mg	Frischgewicht %	Trockengewicht %
Haupttriebspitze	1,69	0,202	11,9	2,79	0,16	1,38
Achseltrieb	1,87	0,180	9,8	2,01	0,08	1,10
Blütenstand	0,16	0,021	12,9	0,46	0,28	2,20
Mittelaltes Blatt	1,24	0,126	10,3	1,27	0,10	1,00
Altes Blatt	1,05	0,102	9,7	1,31	0,12	1,28
Sproßachse	6,41	0,507	7,9	1,08	0,02	0,21

d. h. die Alkaloidbildung übertrifft den Alkaloidabbau so lange, wie auch eine Plasmavermehrung stattfindet. In alternden, absterbenden Pflanzen herrschen dagegen andere Verhältnisse (vgl. Abschnitt IV, 4).

Unter der Voraussetzung einer Parallelität zwischen Sproßwachstum und Tomatinansammlung müßte *das Alkaloidglykosid vornehmlich in meristematischen Geweben lokalisiert sein. Dies ist auch wirklich der Fall.* Mit Hilfe der Blutgelatinemethode konnte beobachtet werden, daß der größte hämolytische Hof stets an Wurzelspitzen, Vegetationskegeln und Blütenknospen auftrat. Analoge Beobachtungen machten auch Fischer u. Thiele (1929), die die Verteilung des Solanins in der Kartoffelknolle mit der gleichen Methode untersuchten. Auch sie gelangten zu der Feststellung, daß das Solanin hauptsächlich „an den Stellen stärksten Wachstums und intensivsten Stoffwechsels" vorkommt.

Ein klareres Bild als diese qualitativen Versuche vermitteln quantitative Untersuchungen. Zu diesem Zweck wurden Ende Februar 1955 zehn Triebspitzen von einer Pflanze abgenommen und zum Bewurzeln in feuchten Sand gesteckt. Die gleichmäßig angewachsenen Stecklinge wurden nach einem Monat umgetopft und nach einem weiteren, als sie eine Höhe von ca. 60 cm erreicht hatten, analysiert (s. Tabelle 2).

Die absolut größte Tomatinmenge ist in den Triebspitzen lokalisiert, das relativ meiste in den sich in intensiver Entwicklung befindenden

Blütenständen. Der höchste Prozentgehalt an Alkaloidglykosid fällt mit dem höchsten prozentualen Anteil an Trockensubstanz zusammen, und die wasserhaltigsten Organe, in diesem Fall die jungen Achsen, sind am tomatinärmsten. Es ist also nicht so, daß ein hoher Prozentgehalt bezogen auf das Trockengewicht durch eine große Wasserspeicherung vorgetäuscht wird. Eine Ausnahme bilden die ausgewachsenen Blätter; sonst ist in den plasmareichen Geweben auch der Hauptteil des Alkaloids zu finden.

Auf Grund dieser Beziehung zwischen Wachstum und Tomatinansammlung müßte das Licht als Wachstumsfaktor einen Einfluß auf den Tomatingehalt der Pflanze haben. Eingehende Untersuchungen in dieser Richtung wurden nicht durchgeführt.

Tabelle 3. *Abhängigkeit des Tomatingehaltes von der Sonneneinwirkung*

Datum	Standort	Frischgewicht je Sproß g	Trockengewicht je Sproß g	Trockensubstanz %	Tomatingehalt mg	Tomatingehalt Frischgewicht %	Tomatingehalt Trockengewicht %
12. 7. 54	sonnig	34,5	5,35	15,4	65,0	0,19	1,22
12. 7. 54	schattig	66,3	7,77	11,7	47,8	0,07	0,62
12. 7. 54	schattig	47,0	4,33	9,2	35,3	0,07	0,82

Lediglich die Beobachtung sei mitgeteilt, daß Pflanzen, die an schattigen Stellen des Gewächshauses aufwuchsen, auch weniger Tomatin führten als besonnte Exemplare, wie die in Tabelle 3 aufgeführten Bestimmungen an drei gleich alten Sprossen zeigen.

Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß die Schattenpflanzen in ihrer generativen Entwicklung stark gehemmt waren. Blütenstände wurden zwar angelegt, kamen aber nicht zur Entwicklung, sondern verkümmerten. Die generative Phase hat aber einen bedeutenden Einfluß auf die Tomatinführung des Sprosses (vgl. Abschnitt IV, 3). Blütenstände haben den höchsten Gehalt. Es kann daher auch sein, daß das Licht keinen unmittelbaren Einfluß auf den Tomatinspiegel ausübt, sondern lediglich über die Förderung der reproduktiven Phase gegenüber der vegetativen wirkt.

Es wurde noch folgender Versuch durchgeführt: Eine Pflanze wurde im Gewächshaus partiell in schwarzes Papier gehüllt, so daß ein Trieb noch in den Genuß vollen Sonnenlichtes kam. Die Papierhaube schloß nicht vollkommen dicht, und daher erhielten die übrigen drei Triebe diffuses Licht. Nach drei Wochen war der besonnte Trieb auf 100 cm herangewachsen, trug drei Achselknospen, die bereits ausgetrieben hatten, und drei Blütenstände, wovon einer schon Früchte angesetzt hatte. Ein Blütenstand befand sich noch in Knospe. Unter dem

Verdunkelungspapier waren die Triebe 80—90 cm lang (allerdings mechanisch gehemmt), die untersten Blätter begannen bereits zu vergilben. Zwei Triebe waren vegetativ und wurden zusammen analysiert, der dritte trug zwei Blütenstände. Die Analysenergebnisse zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4. *Abhängigkeit des Tomatingehaltes bei partieller Verdunkelung der Pflanze*

Datum	Beschreibung	Frischgewicht je Trieb g	Trokkengewicht je Trieb g	Trokkensubstanz %	Tomatingehalt		
					mg	Frischgewicht %	Trokkengewicht %
15. 9. 54	sonnig, blühend	28,8	3,96	13,7	69,6	0,24	1,76
15. 9. 54	schattig vegetativ	22,5	2,73	12,1	35,9	0,16	1,31
15. 9. 54	schattig blühend	23,5	2,87	12,2	35,9	0,15	1,25

Auch in diesem Versuch zeigt sich ein deutlich höherer Tomatingehalt in dem Teil der Pflanze, der stärker der Sonne ausgesetzt war; allerdings war auch seine reproduktive Phase gefördert.

Vielleicht liegt sowohl ein direkter als auch ein indirekter Einfluß des Sonnenlichtes vor. So kommen Fischer u. Thiele sowie Conner (1937) bei Versuchen mit Kartoffelknollen zu dem Ergebnis, daß der Solaningehalt durch Bestrahlung mit UV-Licht erhöht wird. Nach Untersuchungen von Lepper (1943) konnte aber Belichtung *allein* den Solaningehalt der Kartoffelknollen nicht bis zu einer schädlich wirkenden Menge steigern. Er erzielte eine Vermehrung von 8 mg auf 13 mg/100 g bei sehr starker Belichtung und starkem Ergrünen der Kartoffeln. In der gleichen Sorte waren jedoch schon 32,5 mg/100 g gefunden worden. Auf Sproß, Triebe und Wurzeln soll nach Wolf u. Duggar (1946) die Lichtwirkung verschieden sein. Triebspitzen der Kartoffel, die dem Licht ausgesetzt waren, führten bezogen auf das Trockengewicht mehr Solanin als verdunkelte. Bei den Wurzeln dagegen fiel der Prozentgehalt ab, wenn sie belichtet wurden. Die Lichtwirkung auf den Sproß war jedoch größer, so daß bei der Gesamtpflanze eine Steigerung der Solaninmenge bei Belichtung zu verzeichnen war.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß wir es hier mit einem äußerst komplexen Geschehen zu tun haben, dessen Aufklärung sehr umfangreiche Untersuchungen erfordern würde. Ein Versuch mit etiolierten Pflanzen soll in Abschnitt V, 1, mitgeteilt werden.

Wenn man die Ergebnisse dieses Abschnittes zusammenfaßt, so zeichnet sich als sehr wahrscheinlich ab, daß zwischen der Tomatinbildung und dem Wachstum der Tomatenpflanze ein gewisser Zusammenhang besteht. Darauf deuten die parallel gehende Zunahme des Glykoalkaloidgehaltes und des Trockengewichtes im Laufe der

Entwicklung und die vorwiegende Lokalisation in den jungen Geweben hin. Das Licht als Wachstumsfaktor hat einen Einfluß auf den Tomatingehalt.

Zu ganz analogen Ergebnissen kommen auch WOLF u. DUGGAR (1946) bei ihren Untersuchungen über die Physiologie des Solanins in der Kartoffelpflanze: „Many observations of the type referred to in this paragraph make it appear probable that, in general, higher solanine content is associated with higher metabolic activity .... Environmental factors must also be considered, and the growth element is probably dominant". Bei der Verfolgung der Solaningehaltsschwankungen im Laufe der Entwicklung der Pflanze finden sie für die Blätter und Triebspitzen eine Maximumkurve. Gegen Ende der Vegetationsperiode erfolgt ein Abfall, was auch PROKOSCHEW u. Mitarb. (1952a) bestätigen, während die russischen Autoren für den Tomatingehalt der Tomatenblätter eine ständige Zunahme angeben. Die eigenen Untersuchungen in dieser Richtung führten zu den im folgenden Abschnitt geschilderten Ergebnissen.

2. Tomatingehalt im Laufe der Entwicklung

Die Samen enthalten nur Spuren von Tomatin, falls es sich tatsächlich um das Glykosid handelt, vielleicht liegen aber auch die freie Base oder Vorstufen derselben vor. Eine einwandfreie Identifizierung war wegen der winzigen Mengen nicht möglich. Papierchromatographisch zeigte sich ein zusätzlicher rötlich fluorescierender Fleck mit einem geringeren R_F-Wert als Tomatin, wie er auch bei den aus etiolierten Trieben isolierten Produkten gefunden wurde.

Jedoch unmittelbar nach der Keimung, wenn die Wurzelspitze die Samenschale durchbrochen hat, die Kotyledonen sich andrerseits noch in ihr befinden, ist bereits deutlich ein hämolysierender Stoff nachzuweisen.

Die weitere Veränderung des Tomatinspiegels ist in Abb. 2 dargestellt. (Über die Anzuchtbedingungen u. Versuchdurchführung siehe Dissertation.)

Aus den Kurven ist zu ersehen, wie der Alkaloidgehalt mit Eintritt in die reproduktive Phase sprunghaft ansteigt, nachdem während der rein vegetativen Entwicklung nach Ausbildung der Kotyledonen die Tomatinvermehrung relativ zurückgeblieben war. In dieser Periode starker Streckung war aber auch die Vermehrung der Plasmasubstanz relativ gering, wie das niedrige Trockengewicht zeigt.

Überblickt man jedoch die Entwicklung im ganzen, so scheinen die Veränderungen im Tomatingehalt relativ gering zu sein, verglichen mit denen, die in noch kürzerer Zeit in den Blütenständen vor sich gehen.

3. Tomatingehalt der reproduktiven Organe

Häufig war schon das Solanin Gegenstand physiologischer Untersuchungen, aber kaum sind, soweit bekannt, die Blüten und Früchte in die Versuche einbezogen worden, sondern diese erstrecken sich fast ausschließlich auf die Knollen. Es ist nicht ganz einzusehen, wenn Wolf u. Duggar (1946) schreiben: „Flowers were not analyzed in this experiment" (photoperiodisches Verhalten), „but had this been done, the difference between the percentage solanine content of plants in the different day lengths would have been still further emphasized, since flowers run high in solanine and only abortive buds were produced in

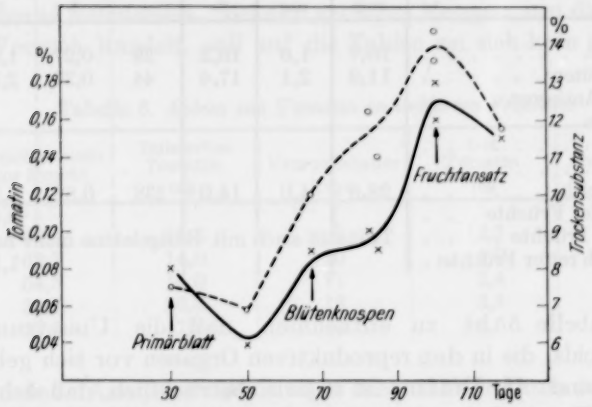


Abb. 2. Tomatingehalt des Sprosses im Laufe der Entwicklung (+—+) und Schwankungen des prozentualen Anteils an Trockensubstanz (○ — — — ○). Abszisse: Alter der Tomatenpflanzen in Tagen. Linke Ordinate: Tomatingehalt bezogen auf das Frischgewicht in Prozent. Rechte Ordinate: Trockensubstanz in Prozent

the short day". Bei physiologischen Versuchen müßten doch gerade die Organe, die den zu untersuchenden Stoff in bevorzugtem Maße enthalten, in erster Linie berücksichtigt werden, zumal in ihnen auch die größten Umsetzungen zu erwarten sind. Aus Seka (1933, S. 682) ist zu entnehmen, daß die Früchte ca. 1% Solanin, Blüten 0,6—0,7% enthalten, während sich der Gehalt aller anderen Organe außer dem Keim auf unter 0,1% beläuft.

Zu einer ganz ähnlichen Verteilung kommt auch Sattler (1912) bei seinen physiologisch-chemischen Untersuchungen von Kulturtomatenpflanzen. Sein als Solanin angesprochenes Alkaloid muß wohl Tomatin sein. Eine einwandfreie Identifizierung war nicht erfolgt, und nach den übereinstimmenden Angaben aller neueren Autoren enthalten die Vertreter der Gattung *Lycopersicon* nur Tomatin. Das von Sattler angewendete Bestimmungsverfahren ist unspezifisch und kann in gleicher Weise für Solanin und Tomatin benutzt werden. Aus seinen Versuchs-

pflanzen konnte er während des ganzen Jahres mit einer Ausnahme stets nur unter 1% Alkaloid bezogen auf das Trockengewicht gewinnen, andrerseits aber in den reproduktiven Organen einen bis zu fünfmal so hohen Gehalt feststellen. Diese Angaben können vollkommen bestätigt werden, wie Tabelle 5 zeigt.

Tabelle 5. *Tomatingehalt von Blüten und Früchten*
Durchschnittswerte aus 500 Blüten bzw. Früchten.

Beschreibung	Frischgewicht je Organ mg	Trockengewicht je Organ mg	Trockensubstanz %	Tomatingehalt γ	Tomatingehalt Frischgewicht %	Tomatingehalt Trockengewicht %	SATTLER Trockengewicht %
Knospen	10,7	1,6	15,2	29	0,27	1,81	2,63
Geöffnete Blüten	11,9	2,1	17,4	44	0,37	2,12	3,4
Bl'krone + Antheren							2,72
Fruchtknoten							5,26
Kelche							3,71
Blütenstiele							1,39
Frucht + Kelch	28,8	4,0	14,0	238	0,82	5,89	
Schale unreifer Früchte						0,41	
Schale reifer Früchte	Tomatin auch mit Blutgelatine nicht nachweisbar						
Stiel + Kelch reifer Früchte						1,12	

Aus Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß die Umsetzungen des Glykoalkaloids, die in den reproduktiven Organen vor sich gehen, ganz bedeutend sind. Ihr Umfang ist sogar so beträchtlich, daß sich die Auswirkungen dieser Umsetzungen über den ganzen Sproß erstrecken und in ihm zu kaum geringeren Gehaltsschwankungen führen können (vgl. Abschnitt V, 3). Vor allem fällt der starke Anstieg in der Zeit unmittelbar nach der Befruchtung auf. *Im gleichen Zeitraum von wenigen Tagen, in dem sich das Trockengewicht der geöffneten Blüten bis zur winzigen Frucht verdoppelt hat, ist ihre Glykoalkaloidmenge mehr als verfünffacht worden.* Dabei ist zu bedenken, daß im gleichen Zeitraum die Blumenkrone und die Antheren abgeworfen wurden, die nach SATTLER ebenfalls beträchtliche Mengen dieses Stoffes führen. Tatsächlich hat sich also das Gewicht des Fruchtknotens und sein Tomatingehalt noch stärker vermehrt.

Auf diese starke Ansammlung im Fruchtknoten folgt ein sehr schneller Schwund. Entsprechende Ergebnisse haben PROKOSCHEW u. Mitarb. (1952a) erhalten: „In ausgewachsenen Früchten kommen nur unbedeutende Mengen Glykoalkaloid vor, dessen Beschaffenheit sich zudem infolge des niedrigen Gehaltes nicht feststellen ließ“ (Übersetzung aus dem Russischen). Die Schale reifer Früchte wurde als einziger Teil der Pflanze absolut frei von Tomatin gefunden. Weniger groß scheinen die Veränderungen in den Blüten- bzw. Fruchtstandstielen zu sein.

Es drängte sich nun die Frage auf, ob in den Früchten ein Abbau stattfindet oder ob das Tomatin in den Sproß abwandert. Um diesem Problem näherzukommen, wurde folgender Versuch angesetzt:

In ausgewachsene, isolierte unreife Früchte einer gelben Kulturvarietät wurde eine 1%ige Tomatinlösung in 1%iger Essigsäure injiziert. An der Einstichstelle, vor allem aber dort, wo sich in dem Hohlraum der Frucht das Glykoalkaloid ansammelte, traten Nekrosen auf. Sonst war keine Schädigung zu erkennen. Nach 13tägigem Lagern bei Zimmertemperatur war die Frucht vollkommen gelb und wurde in frischem Zustand untersucht. Wie aus den mitgeteilten Analysenergebnissen (Tabelle 6) zu ersehen ist, *war in allen Fällen ein z. T. beträchtlicher Alkaloidschwund festzustellen*. Bei den geringen Mengen, um die es sich bei diesem Versuch handelt, soll auf die Zahlen an sich kein großer Wert

Tabelle 6. *Abbau von Tomatin in isolierten Früchten*

Frischgewicht der Frucht	Injiziertes Tomatin mg	Versuchsdauer Tage	Gef. Tomatin mg	Abnahme %
45,0	18,5	5	12,7	31
62,7	14,0	10	4,0	71
54,5	14,0	11	2,4	83
39,7	26,5	13	3,1	88
37,5	17,5	13	2,6	85

gelegt werden. Analysenfehler sind in diesem Falle kaum zu vermeiden, zumal sich die essigsauren Auszüge und ammoniakalischen Niederschläge extrem schwer filtrieren ließen. Immerhin ist damit zu rechnen, daß 2—6 mg Tomatin in der Frucht selbst vorhanden waren, so daß der tatsächliche Abbau noch größer ist.

Das isolierte Tomatin wurde wie üblich papierchromatographisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß das Produkt frei von Tomatidin war; es konnte sich bei dem Abbau also keineswegs nur um eine hydrolytische Spaltung des Glykosides handeln. Tomatidin hätte auf Grund seiner basischen Eigenschaften bei dem angewendeten Isolierungsverfahren mit erfaßt werden müssen. Höchstwahrscheinlich ist die reifende Frucht der Sitz eines Fermentsystems, das Steroide aufzuspalten vermag.

Dieser Versuch erhält durch die Beobachtung eine Bestätigung, daß junge, unreife Früchte bitterlich und kratzend schmecken und sie bei der Reife im isolierten Zustand diesen Geschmack verlieren, der wohl auf die Gegenwart von Tomatin zurückzuführen sein dürfte. Es ist also sehr unwahrscheinlich, daß Tomatin in den Sproß abwandert, vollends wird dies aber durch die in Abschnitt V, 3, beschriebenen Versuche bestätigt, in denen gezeigt wird, daß Pflanzen, die keine Früchte ausbilden, Tomatin ansammeln. Mit anderen Worten, das Gegenteil ist der Fall,

Glykoalkaloid wandert in die Frucht ein, die als Hauptabbaustätte dieses Stoffes anzusehen ist.

4. Tomatingehalt alter, absterbender Pflanzen

Es wurde bereits hervorgehoben, daß sich auch noch in alten, absterbenden Tomatenpflanzen Alkaloidglykoside nachweisen lassen. SATTLER gibt sogar an, in Blättern am 30. 10. 2,56% Alkaloid bezogen auf das Trockengewicht gefunden zu haben, während er im Frühjahr und Sommer stets einen Gehalt der Blätter von unter 1% feststellen mußte. KUHN u. Mitarb. (1950) berichten, daß der Tomatingehalt im Laufe der Entwicklung etwas absinke. Doch fanden auch sie Mitte Oktober noch deutlich nachweisbare Mengen und stellten gleichzeitig eine starke Schwankung im Laufe der Vegetationsperiode fest, was auch KERN bestätigen konnte. Diese Befunde sind insofern interessant, als bei anderen Alkaloiden, z. B. dem Nicotin und Hyoscyamin, in alternden Blättern eine Gehaltsverminderung festgestellt wurde (MOTHES 1955). SATTLER fand jedoch am 15. Januar in Blättern von Pflanzen, „die dem hartgefrorenen Boden entnommen worden waren", noch einen Glykoalkaloidgehalt von 0,92% des Trockengewichts. Diese Angaben konnten bestätigt werden.

Auf die Höhe des Gehalts soll in diesem Zusammenhang kein allzugroßer Wert gelegt werden. Er ist von zu vielen Faktoren abhängig, die im einzelnen noch nicht bekannt sind. Doch ist die Tatsache festzuhalten, daß auch das tote Gewebe der Tomatenpflanze beträchtliche Mengen Glykoalkaloide enthält, die dem Boden mit dem Laubfall zugeführt werden. Es wäre interessant, etwas über den mikrobiologischen Abbau im Boden zu erfahren. Vielleicht verläuft er über bedeutungsvolle Zwischenstufen, da die mikrobiologische Oxydation der Steroide für Hormonsynthesen große Bedeutung gewonnen hat.

Tabelle 7. *Steroidalkaloidgehalt vertrockneter Blätter (Gewächshauspflanzen)*

Datum	Bezeichnung	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Trockensubstanz %	Tomatingehalt		
					mg	Frischgewicht %	Trockengewicht %
21. 1. 55	K 4	9,68	8,00	82,7	232,2	2,40	2,90
10. 2. 55	K 6	10,18	8,59	84,9	213,5	2,09	2,48
14. 2. 55	K 1	18,85	16,06	85,2	431,2	2,29	2,69
18. 2. 55	K 2	19,30	16,77	86,9	460,1	2,39	2,74
24. 2. 55	K 3	33,20	25,24	76,0	344,5	1,04	1,36
12. 4. 55	K 4 + K 6	8,25	5,88	71,3	117,6	1,42	2,00
3. 8. 55	K 3	8,75	7,45	85,1	132,7	1,52	1,78
14. 8. 54	Blätter	21,89	10,87	49,6	451,0	2,06	4,14
9. 10. 54	abgestorbener Sproß	5,35	4,78	89,3	148,6	2,78	3,11

Die in Tabelle 7 aufgeführten Analyseergebnisse zeigen, wie beträchtlich die in braunen, vertrockneten Blättern, die nur noch lose am Stengel hängen, enthaltenen Steroidalkaloidmengen sein können.

Die beiden letzten Analysen beziehen sich auf Blätter bzw. einen Sproß, der durch Entfernung der Blütenknospen am Fruchtansatz gehindert worden war. Aus ihnen kann entnommen werden, *daß nicht nur der Entwicklungszustand des Organs seinen Alkaloidgehalt bestimmt, sondern daß dieser außerdem mit dem Zustand des ganzen Sprosses gekoppelt ist.* Hervorzuheben bleibt die Tatsache, daß in alternden vegetativen Organen höchstens ein geringer Abbau von Tomatin festzustellen ist.

V. Beeinflußbarkeit des Glykoalkaloidgehaltes

Zum Schluß sollen Versuche mitgeteilt werden, den Glykoalkaloidgehalt der Tomatenpflanze künstlich zu beeinflussen.

1. Verdunkelungsversuche

Diese Versuche wurden 1954 durchgeführt und dazu Pflanzen verwendet, denen im Frühjahr wiederholt die Blüten entfernt worden waren. Sie konnten also zunächst keine Früchte ansetzen, dafür hatten sie aber in ihren Geweben relativ viel Reservestoffe gespeichert, wie aus den Trockengewichtsprozenten zu schließen ist.

Aus einer größeren Anzahl gleichartig im Gewächshaus herangezogener Pflanzen wurden vier ausgewählt und ihre Sproßsysteme zur Analyse wie folgt unterteilt: 1. frische grüne Triebspitzen; 2. alte Blätter, teilweise welk und vertrocknet; 3. alle Achsen.

Gleichzeitig wurden drei Pflanzen in den Dunkelkasten gestellt und einen Monat lang unter völligem Lichtabschluß gehalten. Zur Analyse wurden sie dann nach dem gleichen Schema aufgeteilt. Alle Blätter und Triebspitzen waren zu diesem Zeitpunkt vergilbt bzw. vertrocknet. An den neugebildeten weißen Triebspitzen konnten in zwei Fällen Blüten beobachtet werden.

Der ganze Versuch wurde im folgenden Monat wiederholt. Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Ein Versuch mit jüngeren, noch intensiv wachsenden Pflanzen mißlang, wohl infolge ihres Mangels an Reservestoffen. Bereits nach 14 Tagen waren sie eingegangen, ohne etiolierte Triebe gebildet zu haben.

Aus den in Tabelle 8 mitgeteilten Ergebnissen ist deutlich zu entnehmen, daß unter extremen Hungerbedingungen kein nennenswerter Abbau von Tomatin stattfindet. Weder die Kontrollpflanzen, noch die in den Dunkelkasten gestellten hatten während der Versuchszeit ihren Gesamtgehalt pro Pflanze verändert. Lediglich im prozentualen Anteil der Triebspitzen, Blätter und Stengel sind gewisse Verschiebungen festzustellen. Es hat den Anschein, daß Tomatin bei den unter Lichtabschluß gehaltenen Pflanzen in den Blättern mobilisiert wird und ein

Tabelle 8. *Der Tomatingehalt nach einmonatiger Verdunkelung (rechte Hälfte) verglichen mit dem normaler gleichalter Lichtpflanzen (linke Hälfte)*

Datum	Beschreibung	Frischgewicht g	Trokkengewicht g	Trokkensubstanz %	Tomatingehalt mg	Tomatingehalt Frischgewicht %	Tomatingehalt Trokkengewicht %	Datum	Beschreibung	Frischgewicht g	Trokkengewicht g	Trokkensubstanz %	Tomatingehalt mg	Tomatingehalt Frischgewicht %	Tomatingehalt Trokkengewicht %
		Normale Lichtpflanzen								Dunkelpflanzen					
29. 7.	Triebspitzen	19,3	2,89	14,9	72,8	0,38	2,53								
29. 7.	Blätter . .	26,0	3,63	13,9	177,3	0,68	4,88								
29. 7.	Stengel . .	52,0	9,23	17,7	65,0	0,12	0,70								
		Durchschnitt je Sproß:								*Durchschnitt je Sproß:*					
		24,3	3,94	16,1	78,8	0,32	2,00								
30. 8.	Triebspitzen	21,0	3,64	17,3	80,2	0,38	2,20	1. 9.	Etiol. Triebe .	21,8	1,89	8,7	18,9	0,09	1,00
30. 8.	Blätter . .	27,8	5,67	20,3	294,1	1,05	5,18	1. 9.	Blätter	14,3	4,02	28,2	123,8	0,87	3,08
30. 8.	Stengel . .	81,7	17,99	22,0	133,5	0,16	0,74	1. 9.	Stengel	102,6	14,49	14,1	159,2	0,15	1,09
		Durchschnitt je Sproß:								*Durchschnitt je Sproß:*					
		32,6	6,82	20,9	126,9	0,38	1,86	1. 9.		46,2	6,80	14,7	100,6	0,22	1,48
1. 10.	Triebspitzen	18,6	2,83	15,2	88,8	0,48	3,14	3. 10.	Etiol. Tr. blüh.	8,5	0,81	9,6	11,4	0,13	1,40
1. 10.	Blätter . .	16,8	4,95	29,4	247,2	1,47	4,99	3. 10.	Blätter	9,5	5,51	57,9	148,0	1,55	2,68
1. 10.	Stengel . .	98,2	17,99	18,3	115,5	0,11	0,64	3. 10.	Stengel	99,5	17,03	17,1	220,8	0,22	1,29
		Durchschnitt je Sproß:								*Durchschnitt je Sproß:*					
		33,4	6,44	19,2	112,9	0,34	1,75			29,4	5,84	19,9	95,0	0,32	1,63

Teil in die Achsen abgewandert ist. Darauf deutet die Verminderung des Gehaltes der Blätter und die Erhöhung des prozentualen Anteils der Stengel. Ob in den etiolierten Trieben eine Neubildung oder eine Zuwanderung stattgefunden hat, muß aber vorerst noch unentschieden bleiben. Auffallend ist, daß in den vergeilten Triebspitzen prozentual genau so viel gefunden wurde wie in jungen grünen Pflänzchen. Allerdings wurde bei der chromatographischen Auftrennung nach Phosphorsäurebehandlung auch ein rötlich fluorescierender Fleck erhalten, der darauf hinweist, daß vielleicht noch andere Steroide zugegen sind. Aus Materialmangel konnte keine nähere Untersuchung erfolgen.

Aus diesem Versuch sollen weitgehende Schlußfolgerungen nicht gezogen werden. Es bleibt lediglich festzustellen: 1. In etiolierten Sproßteilen lassen sich basische Steroide nachweisen. 2. In langanhaltend verdunkelten Sprossen nimmt der Tomatingehalt nicht wesentlich ab. Falls eine vermehrte Dissimilation dieses Glykosides stattfindet, wird sie von resynthetischen Prozessen nahezu ausgeglichen. Dieses Ergebnis wird auch durch weitere Versuche bestätigt, in denen die Pflanzen weniger extremen Hungerbedingungen ausgesetzt wurden, wie ausführlich in der Dissertation dargelegt ist.

2. Welkeversuche

Sowohl bei den in Tabelle 7 mitgeteilten Alkaloidbestimmungen vertrockneter Blätter, als auch bei den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Hungerversuchen war der prozentuale Gehalt welker Blätter, d. h. solcher mit einem hohen Gehalt an Trockensubstanz, ebenfalls verhältnismäßig hoch. Es lag nun die Vermutung nahe, daß vielleicht bei Wassermangel unter sonst günstigen Bedingungen eine Steigerung des Alkaloidglykosidgehaltes zu erzielen sei, zumal Hieke (1940) eine Zunahme der Anthrachinonglykoside bei langsamem Welken festgestellt hat.

Die große Zahl der in dieser Richtung angestellten Versuche (vgl. Dissertation) brachte kein eindeutiges Ergebnis, teils konnte eine Vermehrung des Glykosidgehaltes bezogen auf das Trockengewicht, teils eine Verminderung beobachtet werden. Daher soll an dieser Stelle nicht darauf eingegangen werden.

3. Unterdrückung der reproduktiven Phase

Bei im Sommer 1954 durchgeführten Versuchen wurde festgestellt, daß Pflanzen mit geringem Fruchtansatz einen höheren Tomatingehalt aufwiesen als solche mit reicher Fruchtbildung. Diese Beobachtung ließ sich reproduzieren.

Bei gleichartig aufgezogenen Stecklingen eines Klones wurden die Blütenknospen entfernt und der Gehalt des ganzen Sprosses mit dem der Kontrollen verglichen. Nach drei Monaten begannen bei den Kontrollpflanzen die ersten Früchte zu reifen. Die in ihrem Sproß gefundene Tomatinmenge war um 25% geringer als die der vegetativen Exemplare. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Wachstum überhaupt, und ebenso der Blüten- und Fruchtansatz von September bis November nicht

bedeutend waren. Dieser Versuch wurde wiederholt und führte zu den in Tabelle 9 wiedergegebenen Ergebnissen.

Die Stecklinge von K 2 waren am 12. 1. 55 in feuchten Sand gesetzt worden. Nach guter Bewurzelung konnten sie am 8. 2. umgetopft werden. Von diesem Zeitpunkt an wurde ein Teil vegetativ gehalten, während die Kontrollen unter sonst völlig gleichen Bedingungen heranwuchsen und ihre Früchte sich zu färben begannen, als die Alkaloidbestimmungen durchgeführt wurden.

Während die Frisch- und Trockengewichte der vegetativen Pflanzen gegenüber den blühenden und fruchtenden um ca. 30% zunahmen, *ist bei der Tomatinmenge eine Steigerung um über 100% zu verzeichnen.* Wenn man den in Abschnitt IV, 3 mitgeteilten Befund über den Abbau

Tabelle 9. *Unterdrückung der reproduktiven Phase bei von K 2 abgeleiteten Pflanzen*

Datum	Beschreibung	Frischgewicht je Sproß g	Trockengewicht je Sproß g	Trockensubstanz %	Tomatingehalt		
					mg	Frischgewicht %	Trockengewicht %
23. 4.	blühend + fruchtend	98,2	18,53	18,9	129,8	0,13	0,70
23. 4.	blühend + fruchtend	72,2	12,22	16,9	95,8	0,13	0,78
25. 4.	blühend + fruchtend	135,9	22,84	16,1	194,6	0,14	0,85
27. 4.	blühend + fruchtend	94,6	15,74	16,6	106,9	0,11	0,68
25. 4.	vegetativ	165,7	28,62	17,3	333,0	0,20	1,16
26. 4.	vegetativ	111,5	20,10	18,0	270,9	0,24	1,35
27. 4.	vegetativ	107,8	20,43	18,9	261,0	0,24	1,28
Durchschnitt blüh. + frucht.		100,2	17,33	17,1	131,8	0,13	0,75
Durchschnitt vegetativ . . .		128,3	23,05	18,1	288,3	0,23	1,26
Steigerung		+28%	+33%	+6%	+118%	+77%	+68%

von Glykoalkaloid in der Frucht berücksichtigt, so erhält dieses Ergebnis eine leicht einzusehende Deutung. Die Hauptabbaustätten wurden beseitigt und daher konnte sich das Tomatin im Sproß anreichern. Außerdem folgt aus diesem Ergebnis, daß eine Zuwanderung von Glykoalkaloid in die Früchte stattfinden muß. Hätte ein Abbau lediglich in situ stattgefunden, so hätte der Alkaloidgehalt in den vegetativen Teilen unverändert sein müssen. Bei einer Abwanderung aus den Früchten wäre eine Steigerung zu verzeichnen gewesen, tatsächlich wurde aber in den Pflanzen, die überhaupt keine Früchte trugen, mehr Glykoalkaloid gefunden.

Damit ist natürlich nichts über die Tomatinbildung in reproduktiven Organen ausgesagt. Besonders die Möglichkeit einer Entstehung dieses Steroids im Fruchtknoten bleibt noch durchaus offen (vgl. Abschnitt IV, 3).

Vielleicht handelt es sich bei dem Abbau von Glykosteroidalkaloid in den Früchten um ein allgemeines Prinzip. Weitere Versuche müßten darüber Aufklärung bringen. Einige ältere Ergebnisse (Fischer 1928; Roberg 1937) machen diese Vermutung nicht unwahrscheinlich. Auch der auffallend hohe Solaningehalt in den Kartoffelblüten deutet in diese Richtung. Wesentlich scheinen in diesem Zusammenhang einige Bemerkungen von Wolf u. Duggar (1946), die wörtlich angeführt seien:

„The unusually high solanine concentrations of otherwise normal potato tubers reported by some workers has never been satisfactorily explained. The marked decrease of solanine in old leaves and the depletion trend in the entire aerial portion of the plant toward the end of the growing season, without its reappearence in the roots or tubers in equivalent amount, further indicate that solanine is destructively metabolized during the development of the plant ..... approximately 284 mg disappeared from the tops, whereas the maximum solanine content of tubers was only about 36 mg. The glycoside is apparently metabolized toward the end of the growing season."

VI. Besprechung der Ergebnisse

Es scheint verlockend, auf Grund der mitgeteilten Versuchsergebnisse Theorien über die Bildung und den Abbau von Tomatin aufzustellen, zumal eine besondere Beziehung dieses Steroids zur generativen Phase festgestellt wurde und Steroide im Tierreich als Sexualhormone auftreten. Solange aber kein umfangreiches experimentelles Material vorliegt, sind derartige Spekulationen fruchtlos, und es soll daher im folgenden gezeigt werden, wie man die gewonnenen Anhaltspunkte weiter ausbauen kann, um für theoretische Überlegungen eine sichere experimentelle Basis zu gewinnen.

Vor allem macht sich der Mangel eines geeigneten analytischen Verfahrens bemerkbar. Zunächst geht es vielleicht weniger darum, ob das Tomatin einheitlich ist oder nicht, als vielmehr, eine schnellere und sichere Bestimmung des Gesamtgehaltes zu finden. Das gravimetrische Verfahren ist zu umständlich und langwierig, besonders für Reihenversuche. Die von den russischen Autoren (Prokoschew u. Mitarb. 1950) modifizierte „Zuckermethode" erfaßt gerade den Teil des Tomatinkomplexes, in dem mit den größten Änderungen zu rechnen ist, wenn man die Verhältnisse, die bei Solanin vorliegen, berücksichtigt.

Das Problem der Tomatinbildung scheint von zwei Seiten aussichtsreich bearbeitet werden zu können:

1. Durch Untersuchung der Keimung. Der Same ist sehr ölreich. Tomatin konnte nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Jedoch weist die Fluorescenz mit Phosphorsäure auf Steroide hin. Vielleicht finden sich im Unverseifbaren Sterine, die als Vorstufen von Tomatidin in Betracht kommen. Die offensichtlich starken Umwelteinflüsse auf die

Tomatinbildung sind während der Keimung noch relativ einfach zu überblicken, und deswegen erscheinen auch in physiologischer Hinsicht methodisch gute Voraussetzungen gegeben.

2. Da die isolierte Wurzel fähig ist, Glykoalkaloid zu bilden, sind von der Organkultur ebenfalls Ergebnisse zu erwarten. Doch müßte dann eine geeignete Mikromethode zur Verfügung stehen, weil mit geringen Mengen zu rechnen ist.

Die generative Phase wird unter dem Aspekt des Abbaus betrachtet werden müssen, vor allem im Hinblick auf die Früchte. Da man in diesem Falle mit isolierten Organen arbeiten kann, liegen zunächst auch methodisch einfache Verhältnisse vor. Als vordringlichste Aufgabe erscheint zunächst der sichere Nachweis eines Fermentsystems, das den Abbau von Glykoalkaloid bewirkt, und gegebenenfalls seine Isolierung. Interessant wäre vor allem, der Frage nachzuspüren, was aus den Spaltprodukten wird. Es ist schwer vorstellbar, daß wir im Tomatin einen sekundären Pflanzenstoff vor uns haben, dem eine physiologische Funktion fehlt. Seine Steroidnatur und das überaus reiche Vorkommen gerade in den jungen generativen Organen, die eine wichtige Aufgabe zu erfüllen haben, machen die Annahme wahrscheinlich, daß ihm eine physiologische Bedeutung zukommt. Naheliegend ist zunächst, an eine Rolle beim Carotinoidaufbau zu denken. Grob gesehen, fällt das Verschwinden von Tomatin mit dem sichtbaren Auftreten dieser Stoffe in der Frucht zusammen. Biogenetische Zusammenhänge zwischen Terpenen und Steroiden sind häufig diskutiert worden. Auch bei verwandten Steroidalkaloiden können ähnliche Verhältnisse vorliegen. Wie z. B. FISCHER (1928) und ROBERG (1937) auf hämolytischem Wege zeigen konnten, führen alle Organe von *Solanum dulcamara* Saponin, nicht dagegen die reifen Früchte, die ebenfalls durch Carotinoidgehalt ausgezeichnet sind. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, vergleichende Untersuchungen mit Früchten anzustellen, die keine Carotinoide, dafür aber Anthocyane enthalten. Als günstigstes Objekt bieten sich in dieser Hinsicht die Vertreter der Untergattung Eriopersicon an, die nach LUCKWILL (1943) nur Anthocyane in ihren Früchten besitzen sollen, aber ebenfalls durch das Vorkommen von Tomatin gekennzeichnet sind.

Zusammenfassung

1. Tomatin wurde auf gravimetrischem Wege bestimmt und anschließend papierchromatographisch charakterisiert.

2. Als Hauptbildungsstätte ist der Sproß anzusehen, doch vermag die isolierte Wurzel ebenfalls Tomatin in geringem Maße zu bilden. Ein nennenswerter Einfluß der Wurzel auf den Sproß ist nicht festzustellen.

Im Blutungssaft konnte Tomatin nicht einwandfrei identifiziert werden. Damit zeigt dieses Glykoalkaloid ein grundsätzlich anderes Verhalten als die übrigen Solanaceenalkaloide (Nicotin, Hyoscyamin).

3. Der Tomatingehalt ist sehr variabel, kann relativ leicht beeinflußt werden und hängt mit dem Wachstum der Pflanze zusammen.

4. Als Hauptabbaustätte wurde die reifende Frucht erkannt. Diese Feststellung stützt sich auf folgende Beobachtungen:

a) Der Tomatingehalt der Frucht nimmt mit der Reife ab.

b) Injiziertes Tomatin ist nach einigen Tagen nur noch in geringerer Menge nachzuweisen.

c) In Pflanzen, die keine Früchte tragen, findet eine starke Ansammlung von Tomatin statt.

Herrn Prof. Dr. Horst Drawert danke ich für die Anregung der Arbeit, Herrn Prof. Dr. Kurt Mothes für eine wertvolle Diskussion. Herrn Dr. Gerhard Schulz, Schering A.G. Berlin, gilt mein Dank für seine hilfreichen Hinweise bei der Papierchromatographie.

Literatur

Brink, N. G., and K. Folkers: Isolation of tomatidine from the roots of the Rutgers tomato plant. J. Amer. chem. Soc. **73**, 4018 (1951). — Conner, H. W.: Effect of light on solanine synthesis in the potato tuber. Plant Physiol. **12**, 79 (1937). — Dawson, R. F.: Alkaloid biogenesis. Adv. Enzymol. **8**, 203 (1948). — Fernholz, H.: Die Sterinalkaloide. In Lettré, Inhoffen u. Tschesche: Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe, S. 247 ff. Stuttgart 1954. — Fischer, R.: Über den mikroskopischen Saponinnachweis durch Blutgelatine. Pharmaz. Mh. **9**, 25 (1928). — Fischer, R., u. J. Thiele: Über den Solaninnachweis in der Kartoffel mit Blutgelatine. Österr. bot. Z. **78**, 325 (1929). — Fontaine, Th. D., G. W. Irving, R. Ma, J. B. Poole and S. P. Doolittle: Isolation and partial characterisation of crystalline tomatine an antibiotic agent from the tomato plant. Arch. of Biochem. **18**, 467 (1948). — Gupta, M. P., and S. Dutt: Chemische Untersuchung der Samen von Solanum xanthocarpum. J. Ind. chem. Soc. **15**, 95 (1938). C. **1938**, II, 3101. — Hieke, K.: Der Anthrachinonstoffwechsel in Polygonaceen. Bot. Archiv **41**, 113 (1940). — Irving, G. W., Th. D. Fontaine and S. P. Doolittle: Lycopersicin a fungistatic agent from the tomato plant. Science (Lancaster, Pa.) **102**, 9 (1945). — James, W. O.: Alkaloids in the plant. In Manske u. Holmes, The Alkaloids, Bd. I, S. 15. New York 1950. — Kern, H.: Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen Fusarium lycopersici. Phytopath. Z. **19**, 351 (1952). — Kofler, L.: Saponine. In G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. III/2 S. 1095ff. Wien 1932. — Kuhn, R., u. A. Gauhe: Über die Bedeutung des Demissins für die Resistenz von Solanum demissum gegen die Larven des Kartoffelkäfers. Z. Naturforsch. **2b**, 407 (1947). — Kuhn, R., u. J. Löw: Über Demissin, ein Alkaloidglykosid aus den Blättern von Solanum demissum. Chem. Ber. **80**, 406 (1947). — Abbau von Tomatidin zu Tigogeninlakton. Chem. Ber. **85**, 416 (1952). — Die Konstitution des Solanins. Angew. Chem. **66**, 639 (1954). — Die Alkaloidglykoside der Blätter von Solanum aviculare. Chem. Ber. **88**, 289 (1955). Kuhn, R., J. Löw u. A. Gauhe: Über das Alkaloidglykosid von Lycopersicon

esculentum var. pruniforme und seine Wirkung auf die Larven des Kartoffelkäfers. Chem. Ber. **83**, 448 (1950). — Lepper, W.: Belichtung und Solaningehalt der Kartoffeln. Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. **86**, 247 (1943). — Luckwill, L. C.: The genus Lycopersicon. Aberdeen Univ. Stud. **120** (1943). — Marker, R. E., u. J. Lopez: The seasonal variations of sapogenins in plants und biogenesis of steroidal sapogenins in plants. J. Amer. chem. Soc. **69**, 2375, 2383 (1947). — Mothes, K.: Chemische Physiologie der Pflanzenalkaloide. Angew. Chem. **64**, 254 (1952). — Physiology of alkaloids. Annual Rev. Plant Physiol. **6**, 393 (1955). Neher, R., u. A. Wettstein: Farbreaktionen mit Steroiden, insbesondere Corticosteroiden, im Papierchromatogramm. Helvet. chim. Acta **34**, 2278 (1951). — Prelog, V., u. O. Jegor: The chemistry of solanum and veratrum alkaloids. In Manske u. Holmes, The Alkaloid, Bd. III, S. 247. New York 1953. — Prokoschew, S. M., E. J. Petrotschenko u. W. S. Baranowa: Vergleichende Untersuchungen des Solanins, Demissins und Tomatins. (Russ). Dokl. Akad. Nauk SSSR. **74**, 339 (1950). — Die Veränderlichkeit des Tomatingehaltes in den Blättern der Tomaten. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **83**, 261 (1952a). — Prokoschew, S. M., E. J. Petroschenko, G. S. Iljin, W. S. Baranowa u. N. A. Lebedewa: Die Glykoalkaloide in den Blättern und Knollen vegetativ gepfropfter Solanaceen. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **83**, 881 (1952b). — Roberg, M.: Über das Vorkommen und die Verteilung von Saponinen in Kräuterdrogen. Arch. Pharmaz. **275**, 84, 145 (1937). — Sato, Y., and H. G. Latham jr.: The isolation of diosgenin from Solanum xanthocarpum. J. Amer. chem. Soc. **75**, 6067 (1953). — Sato, Y., A. Katz and E. Mosettig: Degradation of tomatidine. J. Amer. chem. Soc. **73**, 880 (1951). — Sattler, E.: Beiträge zur Lebensgeschichte der Tomatenpflanze. Diss. Tübingen 1912. — Schreiber, K.: Die Glykoalkaloide der Solanaceen. Chem. Techn. **6**, 648 (1954). — Seka, R.: Alkaloide. In G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. IV/1, S. 476. Wien 1933. — Tschesche, R.: Neuere Vorstellungen auf dem Gebiete der Biosynthese der Steroide und verwandter Naturstoffe. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **12**, 131 (1955). — Tschesche, R., u. F. Korte: Zum biochemischen Syntheseweg der Steroide. Angew. Chem. **64**, 633 (1952). — White, Ph. R.: Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. **9**, 585 (1934). — The Cultivation of Animal and Plant Cells. New York 1954. — Woker, G.: Die Chemie der natürlichen Alkaloide. Stuttgart 1953. — Wolf, M., J., u. B. M. Duggar: Estimation and physiological role of solanine in the potato. J. agricult. Res. **73**, 1 (1946).

Apotheker Dr. H. Sander, Berlin-Dahlem,
Pflanzenphysiolog. Institut der Universität, Königin-Luise-Str. 1—3

Planta, Bd. 47, S. 401—446 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen

WACHSTUM UND ORGANBILDUNG AN IN VITRO KULTIVIERTEN SEGMENTEN VON PELARGONIUM ZONALE UND CYCLAMEN PERSICUM

Von

LUCIE MAYER

Mit 23 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. März 1956)

Einleitung

Die durch R. J. GAUTHERET u. P. R. WHITE (1943) ausgearbeiteten Methoden, pflanzliche Gewebestücke durch Kultur in vitro zu weiterem Wachstum und Entwicklung anzuregen, ermöglichten erstmalig auch eine experimentelle Inangriffnahme zahlreicher Probleme pflanzlicher Differenzierungsvorgänge. In erster Linie handelt es sich dabei um die Frage nach den Faktoren, die in einem undifferenzierten Kallusgewebe die Anlage organisierter Wurzel- und Sproßvegetationskegel auszulösen vermögen.

Von F. SKOOG u. CH. TSUI (1948) waren auf diesem Wege bei Stengelstücken von *Nicotiana tabacum* Versuche unternommen worden, um die für die Anlage von Sproß- und Wurzelvegetationspunkten notwendigen Faktoren zu erfassen und die Entwicklung willkürlich in die eine oder andere Richtung zu lenken. Es schien wünschenswert, diese an einem einzigen Objekt gemachten Erfahrungen auch anderweitig anzuwenden; hierzu mußte jedoch ein Objekt verwendet werden, das nicht wie etwa *Solanum nigrum* und *Lycopersicum esculentum* schon von sich aus in den Pfropfversuchen die Fähigkeit zur Bildung von Sproß- und Wurzelvegetationskegeln zeigt. Die Wahl fiel zunächst wegen einer gewissen anatomischen Ähnlichkeit mit dem Tabak, vor allem der ziemlich ausgeprägten Sukkulenz, auf *Pelargonium zonale*. Während sich aber *Pelargonium zonale* für Fragen der Kallus- und Wurzelbildung als durchaus geeignet erwies, gelang es nicht, auch Sproßbildung hervorzurufen. Es wurde daher, nicht zuletzt angeregt durch gewisse Bedürfnisse der züchterischen Praxis, *Cyclamen persicum* in die Untersuchung mit einbezogen, wobei die Frage beantwortet werden sollte, ob Knollengewebestücke zur Entwicklung von Sproß- und Vegetationspunkten veranlaßt werden könnten. Im Gegensatz zu *Pelargonium zonale* erwies sich *Cyclamen persicum* als ein in jeder Hinsicht außerordentlich günstig ansprechendes Objekt, so daß die gestellten Fragen weitgehend beantwortet werden konnten.

A. Pelargonium zonale

Material und Methode

Für die Versuche wurde im wesentlichen eine seit vielen Jahren im Botanischen Garten Erlangen kultivierte lachsrote gefüllte Varietät von *Pelargonium zonale* verwendet, deren Sortenbezeichnung jedoch nicht mehr feststellbar war. Vereinzelte Versuchsreihen wurden dazwischen auch mit anderen Pelargoniumsorten durchgeführt, ergaben jedoch keine merklichen Unterschiede im Wachstum und Verhalten der Kulturen.

Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Gewebekultur ist die Methode. Obwohl sich diesbezügliche Angaben sowohl bei R. J. GAUTHERET als auch bei P. R. WHITE (1943) in reichlichem Maße finden, soll die Methode, die sich in diesen Versuchen als optimal erwies, in allen Einzelheiten beschrieben werden, da sie doch in manchen Punkten abweicht und weil durch sie der Ausfall an Kulturen durch Pilz- oder Bakterienbefall auf im Durchschnitt 10—15% herabgedrückt werden konnte.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Aufnahmegefäße und der Nährlösung. Als Aufnahmegefäße dienten Reagenzgläser vom Durchmesser 1,2 cm. Sie wurden mit heißem Wasser und Pril sorgfältig gespült — nicht mit Chromschwefelsäure — und mit Aqua destillata nachgewaschen, bei 160° getrocknet und mit einem Wattebausch versehen. Die Gläser wurden dann zu je zehn mit wasserdichtem Papier bedeckt und einem Gummiband gebündelt bei $^1/_2$ Atm. 20 min im Autoklaven sterilisiert. Auf diese Weise wird vermieden, daß die Watte naß wird und später einen Herd für Bakterien und Pilze bildet. Inzwischen konnte in einem 1 Liter-Kolben die Nährlösung angesetzt werden; die Grundlösung dazu war in einer Konzentration 25 cm^3 = 1 Liter vorrätig. Nach Zugabe von Zucker und Agar erfolgte ebenfalls Sterilisation bei $^1/_2$ Atm. 20 min. Die fertige Nährlösung wurde heiß in die Reagenzgläser gegossen, und zwar 14 cm^3 in jede Cuvette; das Glas ist dann knapp halb voll und enthält noch ausreichend Luft für das Wachstum der Gewebe. Dann mußte nochmals 10 min bei $^1/_2$ Atm. unter Bedeckung der Reagenzgläser mit Zellophan — zur Vermeidung von Feuchtigkeit — sterilisiert werden. Hitzelabile Substanzen wurden erst vor dieser letzten Sterilisation hinzugefügt und — je nach Empfindlichkeit der Verbindung — Druck und Sterilisationsdauer entsprechend herabgesetzt. Die an einen trockenen Ort gebrachten Aufnahmegefäße blieben stehen, bis alle an den Glaswänden hängenden Wassertropfen eingetrocknet waren (etwa 1—$1^1/_2$ Tage). Eventuell am Glas anhaftendes Wasser sammelt sich sonst auf dem eingelegten Gewebe an und verursacht in kurzer Zeit Nekrose und Absterben der Kulturen.

Nun folgte die allgemeine Zubereitung der eingelegten Gewebestücke; Stengel mittlerer Dicke von *Pelargonium zonale* wurden abgeschnitten und zunächst die Blätter möglichst kurz über der Ansatzstelle entfernt. Verholzte Stengelteile, ebenso wie zu junge, mußten verworfen werden, so daß schließlich die durchschnittliche Länge der verwendeten Stengelstücke 10—15 cm betrug. Dann erfolgte zunächst eine oberflächliche Reinigung der Stengel durch Abwaschen mit lauwarmem Wasser; zur

eigentlichen Sterilisation wurden folgende Agentien auf ihre Brauchbarkeit erprobt, wobei als Maß der Brauchbarkeit jeweils der Prozentsatz der durch Pilze oder Bakterien befallenen Kulturen angegeben wird.

1. Einfaches Abreiben mit 70% Alkohol . . . . . Befall 70%
2. Einlegen in 2-, 5-, 10%ige Tegolösung, 15 min (Fa. Goldschmitt, Essen) Befall 72%
3. Einlegen in 0,5%ige Pril-Lösung, 20 min (Fewa-Werke, Düsseldorf) Befall 80%
4. Einlegen in 0,1%ige $HgCl_2$-Lösung, 15 min (Merck) . . . . . toxisch
5. Einlegen in 0,1%ige $HgCl_2$-Lösung und 0,1%ige Pril-Lösung, 10 min toxisch
6. Einlegen in 60%ige Ca-Hypochlorit-Lösung, 20 min (Merck) . . . Befall 50%
7. Einlegen in Na-Hypochlorit-Lösung (Merck, Cl-Gehalt 50%)
   a) 15 min . . . . . a) Befall 15%
   b) 3 Std . . . . . b) Befall 15%
   c) 1 Tag . . . . . c) teilweise toxisch
   d) 2 Tage . . . . . d) toxisch
8. Einlegen in 2,4-Dinitrophenol (DNP) in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-7} . . . . . toxisch

Die Verfahren 1, 2, 3, 6 waren wegen der hohen Ausfälle durch Bakterien gänzlich unbefriedigend. 4, 5, 7d, 8 führten zur Abtötung der Stengelsegmente, am besten bewährte sich Methode 7a. Im folgenden wurde daher ausschließlich danach gearbeitet, also die Stengelstücke 15 min in Na-Hypochlorit-Lösung eingelegt.

Eine eventuelle Verbesserung der Sterilisationsmethode, die der ausschlaggebende Punkt für das Gelingen der Gewebekulturen ist, wurde durch Zugabe von 2,4-DNP in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-7} zur *Nährlösung* versucht. Durch eine zufällige Beobachtung konnte nämlich festgestellt werden, daß eine unsterile Nährlösung, die offen in einem Gefäß stand und geringe Mengen an 2,4-DNP enthielt, noch nach zwei Wochen keinen Bakterien- oder Pilzbefall aufwies. Tatsächlich traten auch in unsterilisierten Kulturen, die Zusätze von 2,4-DNP enthielten, Bakterien erst nach 2—3 Wochen auf. Höhere Gaben von 2,4-DNP, die einen Bakterienbefall auf noch längere Zeit hätten unterdrücken können, wirkten sich jedoch toxisch auf die Kulturen aus. Da die Versuche durchschnittlich 50 Tage liefen, konnte die 2,4-DNP-Methode nicht angewendet werden.

Der Abschluß der Desinfektion bestand schließlich darin, die durch Na-Hypochloritlösung desinfizierten ganzen Stengelstücke mit reichlich Aqua steril. nachzuwaschen, etwa 1 Liter für 5 Stengel.

Während die bis jetzt besprochene Desinfektion in jedem beliebigen Raum erfolgen konnte, mußten alle folgenden Manipulationen in einer Impfkabine durchgeführt werden, in der sich lediglich ein Glastisch und ein leicht abwaschbarer Hocker befanden. Um alle Infektionsmöglichkeiten weitgehend zu verringern, wurden die gekachelten Wände des Raumes des öfteren mit 0,2%iger $HgCl_2$-Lösung gereinigt; außerdem befand sich in der Kabine eine UV-Röhre, die vor Benutzung des

Raumes 1 Std den Arbeitsplatz direkt bestrahlte, während der Arbeit jedoch gegen die Decke der Impfkabine gerichtet war, da nach D. HARE u. H. KERSTEN eine unmittelbare Bestrahlung Schädigungen der Gewebestücke und chemische Umsetzungen in der Nährlösung hervorrufen kann.

Ausschlaggebend für den Erfolg der nun folgenden Arbeitsgänge ist auch die absolute Sauberkeit der benutzten Instrumente. Alle verwendeten Instrumente wurden deshalb vor Beginn der Arbeit etwa 1 min in kochendes Wasser getaucht und nach einmaliger Benutzung jeweils erneut kurz gekocht. Diese Methode (P. R. WHITE 1943) erwies sich als wesentlich günstiger als bloßes Abflammen der mit Alkohol benetzten Geräte (R. J. GAUTHERET). Erst nach Anwendung von kochendem Wasser als Sterilisationsmittel für alle verwendeten Schneideinstrumente gelang es, den Prozentsatz der durch Bakterien befallenen Kulturen erheblich zu vermindern. Durch Na-Hypochlorit desinfizierte Stengelstücke, die mit abgeflammten Instrumenten zerschnitten wurden, erlitten später Ausfälle bis zu 50%, während bei Schnitten mit ausgekochten Instrumenten die Quote auf 10—15% herabsank. *Als weitere Vorsichtsmaßnahmen wurden* unmittelbar vor Beginn der Arbeit der Laboratoriumsmantel und ein Handtuch 20 min bei $^1/_2$ Atm. *sterilisiert*. Schließlich wurden auch während des anschließenden Zerschneidens der Stengelstücke der Arbeitstisch und die Hände mehrmals mit 70%igem Alkohol gereinigt. Erst nach allen diesen Vorbereitungen und unter ständiger Einhaltung der beschriebenen Maßnahmen begann die weitere Arbeit.

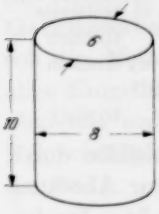


Abb. 1.
Erklärung s. Text

Die Epidermis der Stengel wurde mit einem Skalpell der Länge nach eingeritzt und konnte nun — besonders bei älteren Stengelteilen — mühelos abgezogen werden. In einer sterilen Petrischale wurde darauf der geschälte Stengel mit einer Rasierklinge in Stücke von *d* 10/8/6 mm zerschnitten (Abb. 1).

Die Schalen wurden sofort wieder bedeckt und nur möglichst kurz geöffnet, um die Segmente mit einer Pinzette herauszunehmen und in die Aufnahmegefäße einzulegen. Das Einlegen der zylinderförmigen Segmente auf die Nährlösung erfolgte dergestalt, daß ihre morphologische Oberseite nach unten gekehrt und die Stücke etwa 3 mm in das Substrat getaucht waren.

Die Knoten der Pelargonienstengel, die am schwersten zu sterilisieren sind, da sie immer noch Blattstielreste aufweisen, wurden stets verworfen. Außerdem hätten die in den Knoten eventuell noch vorhandenen Blatt- und Wurzelanlagen irreführende Ergebnisse gezeigt.

In den letzten Experimenten wurde die Form der Segmente dahingehend abgeändert, daß nach einem neueren Bericht von F. Skoog u. C. Miller (1953) die Zylinder durch 3—4 tangentiale Schnitte völlig vom Rindengewebe befreit wurden und durch 3—4 weitere Schnitte auch der Zentralzylinder wegfiel. Aus einem 1 cm langen Stengelstück entstanden auf diese Weise 3—4 Prismen von 10/4/2 mm (bei F. Skoog u. C. Miller 7/5/2 mm), die fast ausschließlich cambiales Gewebe enthielten (Abb. 2).

Im Wachstum und Verhalten zeigten diese Prismen keinen Unterschied gegenüber den vorher verwendeten Zylindern, doch waren die Kulturansätze einheitlicher und die Ausfälle durch Bakterien sogar noch geringer.

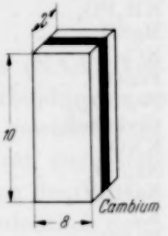


Abb. 2.
Erklärung s. Text

Der Wattebausch, mit dem die Kulturen anschließend wieder verschlossen werden mußten, sowie der Rand der Reagenzgläser wurde bei den ersten Versuchen kurz abgeflammt (R. J. Gautheret). Später wurde von dieser Methode kein Gebrauch mehr gemacht, da nach P. R. White (1943) eventueller Gaseinschluß für die Gewebe ungünstige Wirkungen hat. Im Hinblick auf den Bakterienbefall erwies sich das Abflammen ohnehin als völlig überflüssig. Ebenso zeigte es sich, daß ein nachträglicher Verschluß der Reagenzgläser *über* der Watte mit Zellophanpapier, Zinn- oder Aluminiumfolie, wie er von P. R. White (1943) und R. J. Gautheret als unbedingt notwendig erachtet wird, fehlen kann, ja, sogar besser vermieden werden sollte. Alle Kulturen, von denen hier berichtet wird, standen nach dem — unter den angegebenen Bedingungen möglichst steril durchgeführten — Einlegen an einem durch keinerlei Vorsichtsmaßnahmen gesäuberten Platz, bis auf die Watte ohne Schutz gegen Bakterien, Pilze und Staub. Trotzdem wurde nie eine Spätinfektion beobachtet, die auf Eindringen von Bakterien oder Pilzkeimen *durch* die Watte zurückzuführen war. Dagegen war die Luft- und Sauerstoffversorgung der Kulturen besser und sie trockneten wesentlich schneller ab als bei dichtem Abschluß der Reagenzgläser durch Aluminium- oder Zinnfolie.

Die fertig eingelegten Kulturen wurden zum Teil im Brutschrank bei 25° C aufgestellt, meistens jedoch bei Zimmertemperatur, die zwischen 25° und 30° C schwankte. Die Temperaturunregelmäßigkeiten hatten keine nachteiligen Folgen für das Wachstum der Segmente; die Kulturen wuchsen unter den zuletzt genannten Bedingungen sogar besser und schneller. Die Aufstellung erfolgte in großen Reagenzglasständern, die je 350 Kulturen fassen konnten, ohne jegliche besondere Vorsichtsmaßnahme an einem schattigen Platz im Gewächshaus.

Nachdem durch die beschriebenen Methoden die Möglichkeit gegeben war, den Ausfall innerhalb der Kulturen auf 10—15% herabzudrücken,

mußte schließlich noch die für das Wachstum der Segmente günstigste Nährlösung gefunden werden (Tabelle 1). Die beiden von R. J. GAUTHERET und P. R. WHITE (1946) viel benutzten Nährlösungen erwiesen sich nämlich für *Pelargonium zonale* als ungeeignet. Wachstum und Kallusbildung erfolgten entweder überhaupt nicht oder nur sehr langsam und spärlich. Befriedigende Ergebnisse konnten erst mit einer nach F. SKOOG (1948) hergestellten Lösung erzielt werden, die an sich die gleichen Grundelemente enthält, aber in anderer mengenmäßiger Zusammensetzung. Diese wurde daher fast ausschließlich verwendet und als Standard I (St. I) bezeichnet. Auch eine kombinierte KNOOPsche Lösung, bei der KH_2PO_4 durch NaH_2PO_4 ausgetauscht war und die Spurenelemente in Form der HOAGLANDschen A-Z-Lösung, sowie 10 cm³ Kokosnußmilch hinzugefügt wurden, ergab qualitativ und quantitativ gute Resultate (St. II).

Tabelle 1. *Zusammensetzung der Nährlösung. Die Inhaltsstoffe bezogen auf 1 Liter Lösung*

	Knoop mg	White mg	Skoog mg	Knoop comp. mg
$Ca(NO_3)_2$	500	200	100	500
KH_2PO_4	125	—	—	—
$MgSO_4$	125	300	35	125
KCl	60	65	65	—
$FeSO_4$	Spur	—	—	—
$Fe_2(SO_4)_3$	—	2,5	2,5	2,5
Glykokoll	—	3,0	2,0	2,0
KNO_3	—	80	80	125
Na_2SO_4	—	200	—	—
NaH_2PO_4	—	16,5	12	12,5
KJ	—	0,75	0,75	—
$MnSO_4$	—	4,5	4,4	—
$ZnSO_4$	—	1,5	1,5	—
H_3BO_3	—	1,5	1,6	—
Vitamin B_1	—	0,1	0,1	—
Vitamin B_6	—	—	0,5	—
Acid. nikot.	—	0,5	0,5	—
	cm³	cm³	cm³	cm³
Hoagland's A—Z	—	—	—	1
Kokosmilch	—	—	—	10
	g	g	g	g
Agar-Agar	10	7	7	7
Rohrzucker	30	20	20	20
			Standard	
			I	II

Anfangs wurde nach P. R. WHITE (1940) nur mit 2% Saccharose gearbeitet, es zeigte sich jedoch, daß auch bei Zugabe von 2% Glucose keine Änderung im Wachstum der Kulturen eintrat. Unter Agar wird Agar pulv. für die Bakteriologie (Merck) verstanden, der einfacher abzuwiegen ist und bei dem sich das langwierige Waschen und Filtrieren, welches das Arbeiten mit Stangenagar so umständlich macht, erübrigt.

Vor der letzten Sterilisation wurde der p_H-Wert der Nährlösung bei Kulturen, an denen die Wurzelbildung untersucht werden sollte, auf 6,0, bei solchen, die Versuche zur Sproßbildung darstellten, auf 4,0 gebracht (F. SKOOG 1951). Da der ursprüngliche p_H-Wert durchschnittlich 5,0 betrug, war das mit einigen Tropfen HCl dilut. oder NaOH 16% leicht zu bewerkstelligen.

Die durchschnittliche Laufzeit der Kulturen betrug 49 Tage, danach begann die Nährlösung zu schrumpfen und sich von den Rändern der Reagenzgläser abzulösen.

Ergebnisse

Nach den Befunden an *Nicotiana tabacum* haben sich für die Kallusbildung sowie für die Organdifferenzierung bei pflanzlichen Gewebekulturen einerseits die Wuchsstoffe und andererseits Adenin und diesem nahestehende Verbindungen als entscheidend erwiesen. Beide wurden daher auch in ihrer Wirkung auf *Pelargonium zonale* geprüft.

1. Wuchsstoff

Als Wuchsstoff fand lediglich Naphtyl-3-Essigsäure (NAA) Verwendung, da das leichtlösliche Kaliumsalz dieser Verbindung eine bessere Verteilung des Wuchsstoffes in der Nährlösung gewährleistet. NAA wurde in folgenden Konzentrationen dem Substrat zugesetzt: 0,005, 0,01, 0,08, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,8 mg/l. Die Wirkung des Wuchsstoffes in Abhängigkeit von der Konzentration ist außerordentlich deutlich und zwar einmal in bezug auf die Ausbildung und Entwicklung des Kallus und andererseits auf die Wurzelbildung. Die Anlegung von Wurzeln und die Kallusbildung sind dabei nicht zwei voneinander unabhängige Vorgänge, sondern aufs engste miteinander gekoppelt. Lediglich um die Besprechung der Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten, werden beide Vorgänge getrennt voneinander besprochen.

Einfluß des Wuchsstoffes auf die Kallusbildung. 1. Kontrollversuch (19 Kulturen). Das Wachstum an den Kontrollen ist verhältnismäßig geringfügig. Auf der nach oben gerichteten Querschnittsfläche, also der morphologischen Unterseite entwickelt sich lediglich aus dem Cambium ein schwacher ringförmiger Kallus, während auf der dem Substrat aufliegenden Oberseite keinerlei Veränderungen wahrnehmbar sind. Ein zweiter, ebenfalls schwach ausgebildeter Kallus entwickelt sich aus den subepidermalen Rindenzellen der Stengeloberfläche, und zwar von der dem Nährboden angrenzenden Kante aus nach oben an Stärke rasch abnehmend.

2. 0,005 mg/l NAA (34 Kulturen). Der Einfluß der NAA ist bereits deutlich zu bemerken: Der vom Cambium gebildete Kallus ist stärker als bei den Kontrollen, aus den subepidermalen Randzellen der Stengelaußenseite entwickelt sich dagegen kein Kallus.

Diese Reaktion der Kulturen auf der Schnittfläche wird in den folgenden Versuchsreihen zunächst fortlaufend verstärkt.

3. 0,01 mg/l NAA (53 Kulturen). Die Kallusbildung bleibt hier nicht auf die cambiale Zone beschränkt, sondern sie greift auch auf das angrenzende Mark über, aus dem sich ein kräftiger Kallus emporwölbt.

4. 0,008 mg/l NAA (45 Kulturen). Der Kallus ist noch weiter verstärkt und erreicht eine Höhe von 4 mm, er bleibt aber immer noch beschränkt auf das Cambium und das zentrale Mark.

5. 0,1 mg/l NAA (32 Kulturen). Bei dieser Konzentration erreicht der Kallus auf der Schnittfläche seine stärkste Ausbildung, indem nicht nur das innerhalb des Cambiums gelegene Mark, sondern auch das außerhalb davon gelegene Rindengewebe mit einem starken Kallus überzogen wird. Bei noch weiter gesteigerten NAA-Gaben erfährt nun

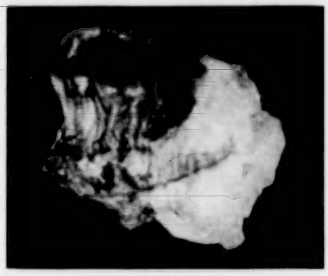


Abb. 3. NAA 0,2 mg/l

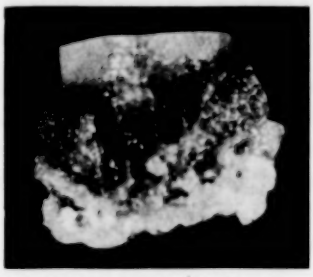


Abb. 4. NAA 0,8 mg/l

der Kallus auf der Unterseite eine Hemmung, während auf der morphologischen Oberseite und an den subepidermalen Randzellen eine fortgesetzt stärker werdende Kallusbildung einsetzt.

6. 0,15 mg/l NAA (51 Kulturen). Aus dem Cambium und dem Mark bildete sich Kallus, gleichzeitig setzte aber auch an den subepidermalen Rindenzellen und der morphologischen Oberseite des Segmentes lebhafte Kallusbildung ein, so daß bei Ende des Versuches beide Querschnittsflächen und die Stengeloberfläche von kräftigem Kallus bedeckt waren.

7. 0,2 mg/l NAA (58 Kulturen). Zunächst wurde aus dem Cambium und dem Mark reichlich Kallus gebildet, nach 14 Tagen begannen sich diese neu entstandenen Zellen jedoch braun zu färben und abzusterben. Gleichzeitig setzte eine lebhafte Teilung der Randzellen an der morphologischen Oberseite des Segmentes ein, so daß bei Ende des Versuches der obere Teil des zylinderförmigen Stückes fast abgestorben war, am unteren Teil aber ein großer Kalluswulst beständig weiterwuchs (Abb. 3).

8. 0,3 mg/l NAA (32 Kulturen). Hier erfolgte keine Kallusbildung mehr aus Mark und Cambium, dafür überzogen sich die Ränder des Segmentes und die morphologische Oberseite mit einem mächtigen Kalluswulst.

9. 0,8 mg/l NAA (45 Kulturen). Aus den subepidermalen Randzellen und der dem Substrat aufliegenden Querschnittsfläche entstehen

große Mengen Kallus. Es bilden sich hier jedoch keine zusammenhängenden Kallusmassen mehr, sondern lediglich ein loser Verband aus einzelnen spiralig aufgerollten Fäden (Abb. 4). R. J. GAUTHERET konnte an Schwarzwurzel- und Endivienkulturen ähnliches beobachten und bezeichnete diese Art der Kallusbildung als Pseudothallien. Das mikroskopische Bild zeigt den losen Zusammenhang der Zellen (Abb. 5).

Abb. 5. NAA 0,8 mg/l

Die genannten Ergebnisse wurden in Abb. 6 nochmals zusammengefaßt und dargestellt.

Wenn wir die Abhängigkeit der Kallusbildung von den der Nährlösung zugesetzten NAA-Gaben überblicken, können wir also zwei gänzlich verschiedene Ergebnisse feststellen.

a) Bei niederen NAA-Gaben wird ein Kallus auf der Querschnittsfläche der Unterseite gebildet, der fortschreitend den Cambiumring, das Mark und zuletzt auch noch die Rinde erfaßt und bei einer Konzentration von 0,1 mg/l NAA seine größte Ausdehnung erfährt. Bei höheren Gaben nimmt er an Stärke

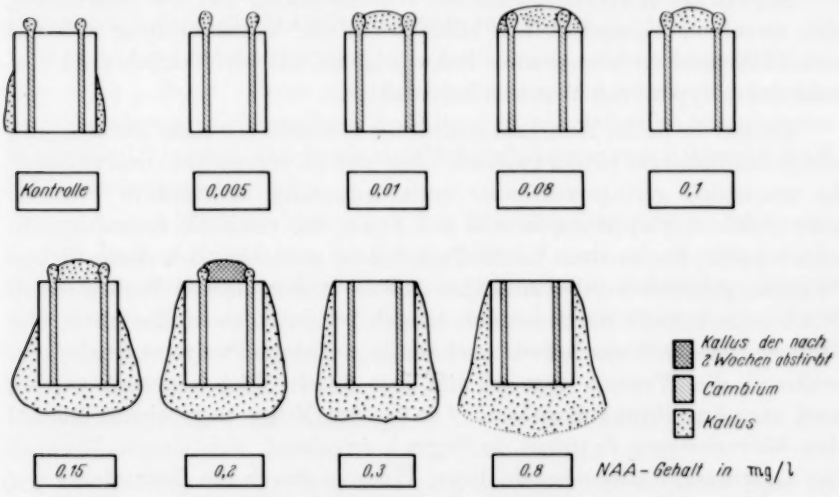


Abb. 6. Schema der Kallusbildung an Stengelsegmenten von *Pelargonium zonale* bei Zusatz von NAA

wieder ab, indem er nicht mehr über das Cambium hinausgreift; bei 0,2 mg/l NAA schließlich wird er zwar noch gebildet, stirbt aber nach

2 Wochen wieder ab. Werden noch höhere Gaben hinzugefügt, so wird er überhaupt nicht mehr angelegt.

b) Bei NAA-Gaben, die für die erste Art der Kallusbildung bereits überoptimal sind, also 0,15—0,8 mg/l, beginnt Kallusbildung auf der Querschnittsfläche der morphologischen Oberseite, greift von dort auch auf die Stengeloberfläche über und erfährt eine außerordentlich mächtige Entwicklung. Schließlich wird bei 0,8 mg/l NAA der gegenseitige Zusammenhang der Kalluszellen weitgehend aufgehoben.

Abb. 7. Kontrolle

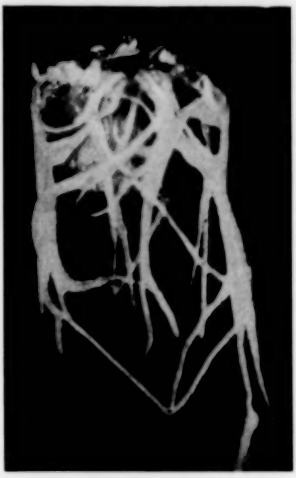


Abb. 8. NAA 0,005 mg/l

Einfluß des Wuchsstoffes auf die Wurzelbildung. Bei der Beurteilung der einzelnen Versuchsreihen hinsichtlich der Wurzelbildung entsteht zunächst insofern eine gewisse Schwierigkeit, als wir deutlich zwei verschiedene Typen von Wurzeln beobachten.

Einmal die in der Mehrzahl gebildeten Wurzeln von einer Dicke 2 mm, die in das Substrat hineinwachsen, ohne sich zu verzweigen, und zweitens in wesentlich geringerem, aber verhältnismäßig konstantem Prozentsatz (0,02—0,2%) Wurzeln von $d = 4$ mm, die reichlich Seitenwurzeln entwickeln. Da in den Kontrollversuchen ausschließlich diese dicken Wurzeln gebildet wurden und ihre Anzahl in den übrigen Reihen durch NAA unbeeinflußt blieb, handelt es sich bei ihnen zweifellos um solche Wurzeln, die sich aus bereits vorhandenen Anlagen weiterentwickelten, während die Wurzeln von d 2 mm erst durch NAA angeregt werden und zur Ausbildung kommen. Die in der Folge angegebene Anzahl der Wurzeln pro Segment (p. Segm.) errechnet sich durch Division der Gesamtzahl aller neugebildeten Wurzeln durch die Gesamtzahl der angesetzten Kulturen.

1. Kontrollversuch (19 Kulturen). Wie schon erwähnt, bilden die Kontrollen ausschließlich dicke verzweigte Wurzeln, die also nicht auf eine Neuanlage zurückgehen, sondern bereits vorhanden sind. Insgesamt

bilden von 19 Kulturen 12 nach 7 Tagen 58 Wurzeln aus, p. Segm. also 3. Diese Wurzeln entspringen in keinem Fall dem Kallus der Schnittflächen, sie brechen alle seitlich durch die Segmente hindurch (Abb. 7).

2. 0,005 mg/l NAA (34 Kulturen). An 17 der 34 Kulturen entstehen insgesamt 196 Wurzeln = 6 p. Segm. Im Gegensatz zu den Kontrollen entspringen diese aber dem cambialen Kallus und sind typisch dünn und unverzweigt (Abb. 8).

3. 0,01 mg/l NAA (53 Kulturen). An 27 Kulturen entspringen dem cambialen Kallus Wurzeln, die ebenso gestaltet sind, wie es Abb. 5 zeigt. Die Zahl der Wurzeln beträgt 354 = 6,2 p. Segm.

4. 0,08 mg/l NAA (45 Kulturen). Entsprechend der stärkeren Ausbildung des Kallus, der bei der gegebenen Konzentration NAA auch das vom Cambium umschlossene Mark umfaßt, werden die Wurzeln sowohl aus dem Mark wie aus dem Cambium gebildet. (241 Wurzeln = 5,4 p. Segm. 10 Wurzeln = 0,2% gehen auf bereits vorhandene Anlagen zurück.)

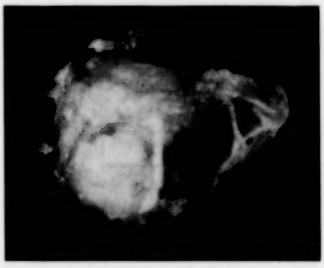


Abb. 9. NAA 0,3 mg/l

5. 0,1 mg/l NAA (32 Kulturen). Insgesamt entstehen 232 Wurzeln = 12,2 p. Segm. Damit ist das Maximum erreicht, bei weiter steigenden Gaben NAA sinkt die Zahl der Wurzeln rasch ab.

6. 0,15 mg/l NAA (58 Kulturen). Auch hier entstehen noch 121 Wurzeln = 2,4 p. Segm. Diese sind jedoch dünner und kürzer als bei den vorangegangenen Kulturreihen. Auffallend ist das plötzliche Absinken der Wurzelneubildungen, die durch eine Mehrzugabe von nur 0,05 mg/l NAA auf $^1/_6$ zurückgegangen ist.

7. 0,2 mg/l NAA (58 Kulturen). Die Wurzeln entspringen nicht mehr dem cambialen Kallus, der bei 0,2 mg/l NAA zwar noch angelegt wird, aber rasch abstirbt, sondern dem mächtig sich entwickelnden subepidermalen Kallus. An den 58 Kulturen entstehen aber nur 7 besonders dünne und kurze Würzelchen, die kaum noch imstande sind, in das Substrat einzudringen.

8. 0,3 mg/l NAA (32 Kulturen). Aus den an den Rändern des Segmentes gebildeten subepidermalen Kalluszellen entstehen 7 dünne und kurze Würzelchen; diese sind aber so zart, daß sie nicht mehr in der Lage sind, das Nährsubstrat zu erreichen oder zu durchbrechen (Abb. 9).

9. 0,8 mg/l NAA (45 Kulturen). Wurzelbildung aus dem subepidermalen Kallus konnte nicht mehr beobachtet werden.

Wenn wir von den wenigen aus bereits vorhandenen Anlagen entstehenden Wurzeln absehen, bilden sich die Wurzeln *stets* aus dem Kallus. Mit der maximalen Ausbildung des cambialen Kallus bei 0,1 mg/l NAA erreicht auch die Wurzelbildung ihr Maximum (vgl. Abb. 6). Ver-

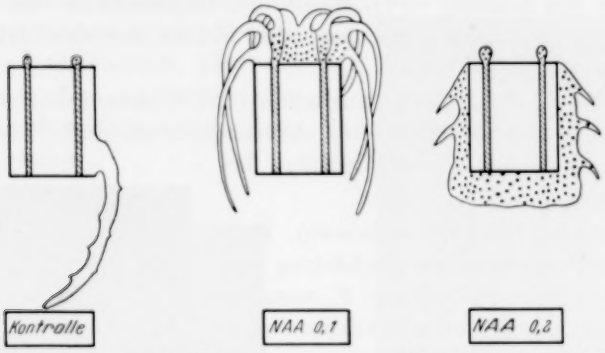


Abb. 10. Schema der Wurzelbildung an Stengelsegmenten von *Pelargonium zonale* bei Zusatz von NAA

schwindet der cambiale Kallus, so entstehen auf der unteren Querschnittsfläche keine Wurzeln mehr, diese entspringen dann vielmehr, wenn auch in äußerst geringer Zahl, dem mächtig entwickelten subepidermalen Kallus (vgl. Abb. 10). Steigende Gaben von NAA haben aber auch in anderer Hinsicht einen Einfluß auf die Wurzelbildung, denn wir beobachten, daß die bei 0,15 mg/l NAA aus dem Kallus entstehenden Wurzeln bereits wesentlich dünner sind als bei den niedrigeren Konzentrationen. Die bei 0,3 mg/l NAA gebildeten Würzelchen sind schließlich so dünn und zart, daß sie überhaupt nicht mehr das Substrat erreichen können.

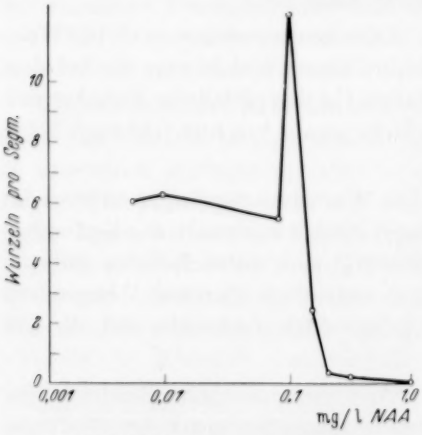


Abb. 11. Wirkung von NAA auf Stengelsegmente von *Pelargonium zonale*

Eine weitere bei allen Versuchsreihen zu beobachtende Tatsache ist die, daß nicht alle Kulturen einer Reihe Wurzeln ausbilden, obwohl alle ziemlich gleichmäßigen Kallus entwickeln. Auffallenderweise ist der Prozentsatz der Kulturen, die Wurzeln entwickeln, innerhalb eines Versuchsansatzes ziemlich konstant. Er ist für die Konzentrationen 0,005, 0,01 und 0,08 mg/l NAA ungefähr der

gleiche (46—47%), steigt bei 0,1 mg/l NAA auf 59% an, um bei 0,15 mg/l NAA auf 31% abzusinken. Kallus- und Wurzelbildung sind also nicht zwangsweise miteinander gekoppelt.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, liegt der Prozentsatz der Wurzeln, die aus bereits vorhandenen Anlagen zur Weiterbildung kommen, in den Kontrollen mit 3% wesentlich höher als in den übrigen Versuchsreihen mit NAA-Zusatz; hier schwankt er zwischen 0,02 und 0,2%. Man könnte an eine Korrelation denken, die zwischen dem Wachstum der bereits vorhandenen Wurzelanlagen und dem des Kallus besteht. Auch zwischen dem Wachstum des cambialen Kallus und des subepidermalen Kallus mögen korrelative Wechselbeziehungen bestehen.

Abb. 10 zeigt die 3 Typen der Wurzelbildung, die an den genannten Versuchen beobachtet werden konnten, in Tabelle 2 sind alle Angaben bezüglich der Wurzelbildung zusammengefaßt; Abb. 11 gibt die Zahl der entstandenen Wurzeln p. Segm. in Abhängigkeit von der Konzentration NAA an.

Eine Kultur von Kallus lag nicht im Sinne der Arbeit, doch wurde sie nebenbei durch Übertragung des in den Kulturen mit Zusatz von 0,2 mg/l NAA reichlich entstandenen subepidermalen Kallus versucht. In keinem Falle konnte ein Ergrünen der Kallusmassen erzielt werden. Das von E. Newcombe beobachtete Ergrünen von Tabakkallus auf Nährsubstraten mit nur 0,2% Zucker an Stelle der üblichen 2% ließ sich an Pelargoniumkallus nicht reproduzieren. Relativ am

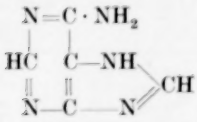
Tabelle 2. *Wirkung von NAA auf Stengelsegmente von Pelargonium zonale.* $T = 25°$ C, NL = St. I, $p_H = 6$

NAA-Gehalt mg/l	0	0,005	0,01	0,08	0,1	0,15	0,2	0,3	0,8
Zahl der Kulturen	20	36	59	63	32	55	66	38	46
Ausfall durch Bakt.	1	2	6	18	—	4	8	6	1
Kallus aus dem Cambium	3	17	27	36	23	27	16	—	—
Kallus aus subepid. Geweben	15	—	—	—	—	19	44	25	16
Kallus aus camb. + subep. Geweben	—	—	—	—	—	13	—	—	—
Zahl d. wurzelbild. Kulturen	—	17	27	29	19	17	2	1	1
Zahl d. gebildeten Wurzeln	—	196	345	241	232	121	7	7	—
geb. Wurzeln pro Segment	—	6,0	6,2	5,4	12,4	2,4	0,3	0,2	—
Wurzeln aus vorhand. Anlagen	—	—	1	10	4	1	—	—	1
vorh. Anlage-Wurzeln pro Segment	58	—	0,02	0,2	0,2	0,02	—	—	0,02
Versuchsdauer	3	30. 11. bis	22. 11. bis	3. 11. bis	22. 11. bis	30. 11. bis	22. 11. bis	22. 11. bis	30. 11. bis
	17. 5. bis 5. 7.	18. 1.	10. 1.	20. 12.	10. 1.	18. 1.	10. 1.	10. 1.	18. 1.

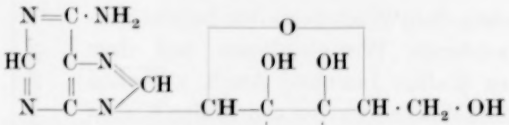
günstigsten für das weitere Wachstum von Kallus erwies sich auch hier St. I mit Zusatz von 0,2 mg/l NAA. In größerem Ausmaß wurde der Pelargoniumkallus jedoch nicht gezüchtet, da trotz häufiger Passagen immer wieder Absterben der Kallusmassen zu beobachten war und bei der Übertragung trotz aller Vorsichtsmaßnahmen oft Bakterien in die Kulturen gelangten.

2. Adenin

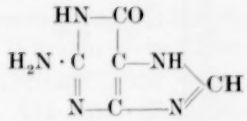
Nach F. SKOOG (1951) wächst bei Tabakstengelsegmenten die Anzahl der Segmente, die Sprosse ausbilden, und die Zahl der neugebildeten Sprosse prozentual der der Nährlösung zugefügten Konzentration Adeninsulfat. Allerdings gilt dies nur für Zusätze bis zu 50 mg/l, höhere Gaben wirken sich toxisch aus. Wie Versuche an Stengelteilen von



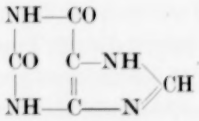
Adenin



Adenosin



Guanin



Xanthin

Tabak, Wurzelgewebe von Karotten und Meerrettichgewebe ergaben, ist die sproßfördernde Wirkung nicht auf Adenin beschränkt, sondern eine Eigenschaft von Verbindungen, die ganz allgemein einen Purinkern enthalten und in der 2,6 Stellung substituierte NH_2-Gruppen haben — oder zumindest an dieser Stelle keine CO-Gruppe. Adenin, Adenosin und Adenylsäure, die diesem Formelbild entsprechen, erhöhten die Anzahl der gebildeten Sprosse an Tabakstengelsegmenten, Guanin, das noch eine CO-Gruppe im Molekül hat, reagiert nach den Berichten von F. SKOOG (1951) langsamer, während Xanthin, Pyrimidin und Uracil völlig unwirksam sind.

Auch A. W. GALSTON u. M. HAND fanden, daß die Blattknospenbildung bei etiolierten Erbsen durch Adenin angeregt wurde. Entsprechende Versuchsreihen wurden daher auch mit *Pelargonium zonale* angesetzt, zumal weder bei den Kontrollen noch bei ganz geringen NAA-Gaben Sproßbildung beobachtet werden konnte, so daß eine eventuelle sproßfördernde Wirkung des Adenins ganz eindeutig festzustellen gewesen wäre.

Adeninsulfat (Merck) ist in kaltem Wasser schwer, in heißem jedoch leicht löslich; die Sterilisation der Nährlösung (St. I) mit den Zusätzen von Adeninsulfat erfolgte im Autoklaven 10 min bei $^1/_2$ Atm., das Adenin wurde dabei nicht zerstört. Sieben Versuchsreihen — einschließlich der Kontrolle — mit Zusätzen von 10, 20, 30, 40, 80, 120 mg/l Adeninsulfat wurden angesetzt; alle insgesamt 126 bakterienfreien Kulturen hatten das gleiche Ergebnis, so daß wir sie gemeinsam besprechen können (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Wirkung von Adeninsulfat auf Stengelsegmente von Pelargonium zonale.* $T = 25^0$ C, NL = St. I, $p_H = 4$, Versuchsdauer 49 Tage

Kontrolle	10	20	30	40	80	120	Adeningehalt mg/l
27	25	41	38	48	39	26	Zahl d. Kulturen
10	25	34	28	30	26	21	Kallus aus dem Cambium
—	—	1	—	10	—	—	Wurzeln aus camb. Kallus
13	—	—	5	—	—	—	Ohne Wachstum

Alle Kulturen zeigten eine, wenn auch schwache, Kallusbildung aus dem Cambium; nach 3 Wochen jedoch fand kein weiteres Wachstum mehr statt und der Kallus begann einzutrocknen. Eine Übertragung der Kulturen auf frische Nährlösung blieb erfolglos; dabei waren die Segmente offensichtlich nicht abgestorben, denn sie zeigten bei Zugabe von Kuzickers Reagenz (0,05% Methylenblau und Methylenrot, neutral) Rotfärbung, sie wuchsen aber nicht mehr weiter.

Offensichtlich wird also bei Segmenten von *Pelargonium zonale* die Kallusbildung ebenso wie bei Tabak durch Zugabe von Adenin unterdrückt. Daß kein subepidermaler Kallus entsteht, ist nicht überraschend. In gleicher Weise wie die Kallusbildung unterdrückt wird, wird auch die durch NAA geförderte Wurzelbildung vom Adenin gehemmt. Die 10 bei Zugaben von 40 mg/l Adenin beobachteten Wurzeln (vgl. Tabelle 3) stammen von *einem* Segment und können als Irrläufer angesprochen werden. Als wesentliches Versuchsergebnis ist jedoch festzustellen, daß sich *keine* Sproßanlagen zeigten.

Tabelle 4. *Wirkung von Adeninsulfat auf Stengelsegmente von Nicotiana tabacum.* $T = 25^0$ C, NL = St. I, $p_H = 4$, Versuchsdauer 49 Tage

80	120	Adeningehalt mg/l
26	5	Zahl der Kulturen
15	3	Kulturen mit Knospen
84	21	Zahl der Sprosse
23	5	Kallus aus d. Cambium

Es wäre immerhin denkbar gewesen, daß der ausbleibende Erfolg auf falsche Methodik zurückzuführen war; deshalb wurden vergleichende Versuche mit Tabaksegmenten angesetzt. Tabelle 4 gibt diese Ergebnisse wieder, aus denen klar hervorgeht, daß unter *gleichen* Arbeitsbedingungen an Tabaksegmenten Sprosse in der von F. Skoog (1944)

beschriebenen Zahl und Art entstehen. Es kann daher als sicher angenommen werden, daß *Pelargonium zonale* auf Adenin nicht mit Sproßbildung reagiert. Daß diese sproßfördernde Wirkung von Adenin durchaus nicht allgemein gilt, zeigt ja auch schon die Angabe von F. SKOOG (1951) selbst, der an Karottenstengelsegmenten durch Adenin ebenfalls keine Sproßbildung hervorgerufen hat.

Der in den Adeninversuchen anfänglich stets auftretende Kallus stirbt schon bald ab. Es ist unter diesen Umständen durchaus verständlich, daß aus diesem Kallus keine Sproßbildung mehr erfolgen kann. Nun hätte es aber sein können, daß an einem intakt gebliebenen Kallus zu einem späteren Zeitpunkt noch Sprosse induziert werden. Um also den für eine Organneubildung bei *Pelargonium zonale* stets notwendigen Kallus zu bekommen, könnte man versuchen, diesen durch geringe, aber für die Kallusbildung ausreichende NAA-Zusätze hervorzurufen. Fügt man außerdem noch Adenin hinzu, so wäre die Möglichkeit gegeben, beständige Kallusbildung und eventuell daraus entstehende Sproßbildung zu erreichen. Solche Versuche wurden auch von F. SKOOG an Tabak (1951) bereits durchgeführt. Sie zeigten, daß Adenin in Verbindung mit kleinen Gaben NAA Organbildungen begünstigt. Es entstehen z. B. in einer mit 40 mg/l Adenin und 0,001—0,005 mg/l NAA versetzten Nährlösung sowohl Sprosse als auch Wurzeln an den Segmenten. Kombiniert man dagegen 40 mg/l Adenin mit 0,02 mg/l NAA, so produziert das Stengelstück nur Kallus, diesen jedoch in großen Mengen.

Zwei Versuchsreihen wurden mit *Pelargonium zonale* angesetzt, einmal mit einer niedrigeren, einmal mit einer höheren Konzentration NAA.

1. 40 mg/l Adenin und 0,005 mg/l NAA (22 Kulturen). An allen Kulturen bildet sich aus dem Cambium ein Kallusring aus, der an Stärke dem Gehalt an NAA entspricht und während des ganzen Versuches erhalten bleibt, ohne abzusterben. Vier Kulturen bilden 16 Wurzeln aus.

2. 40 mg/l Adenin und 0,2 mg/l NAA (18 Kulturen). Auch hier ist das Verhalten in erster Linie bestimmt durch die NAA. Sowohl aus dem Cambium als auch aus den subepidermalen Zellen bildet sich reichlich Kallus, Wurzeln entstanden nicht (Tabelle 5, Abb. 12).

Da bei Zugabe von 0,2 mg/l NAA auch beim Tabak die durch das Adenin an sich begünstigte Sproßbildung unterdrückt wird, war der negative Ausfall des zweiten Versuches zu erwarten. Doch zeigt das Ergebnis der ersten Versuchsreihe, daß bei den reinen Adeninversuchen das Absterben des Kallus *nicht* die Ursache dafür ist, daß keine Sproßbildung auftritt. Auch wenn durch Gaben von 0,005 mg/l NAA ein lebensfähiger Kallus gebildet wird, kommt es nicht zur Sproßbildung.

Die Versuche an Tabak zeigten ganz allgemein, daß in bezug auf die Organbildung die Wuchsstoffe einerseits und Adenin und verwandte Substanzen andererseits Antagonisten sind. Der negative Ausfall der bisherigen Versuche an *Pelargonium zonale* könnte daher darauf zurückzuführen sein, daß die Pelargoniensegmente auch *ohne* besonderen NAA-Zusatz zur Nährlösung noch so viel Wuchsstoff enthalten, daß eine Sproßbildung von vornherein unterdrückt wird. In weiteren 10 Kulturen wurde daher versucht, einen etwa noch vorhandenen Wuchsstoffeinfluß durch Phosphatgaben zu unterdrücken. F. Skoog u. Ch. Tsui (1948) berichten nämlich, daß bei untergetauchten Tabakkalluskulturen die Sproßbildung schon durch Zugabe kleinster Konzentrationen IAA und NAA gehemmt werden kann. Doch ist es möglich, diesen Effekt durch Addition der 4—8fachen Phosphatmenge (50—100 mg/l) aufzuheben. Ebenso beschreibt F. Skoog (1951) eine Vervielfachung der Sproßzahl an Tabakstengelsegmenten durch Kombination von Adeninsulfat mit KH_2PO_4 (4—8fach). Dabei erhöht sich die Anzahl der Sprosse p. Segm. von 16 auf 25 bei 8facher Phosphatzugabe (112,5 mg/l). Folgende Versuchsreihen wurden angesetzt: 1. Kontrollversuch, Adeninsulfat 5, 10, 20, 30, 40 mg/l und 50 mg/l KH_2PO_4. 2. Kontrollversuch, Adeninsulfat 20, 30, 40 mg/l und 100 mg/l KH_2PO_4 (Tabelle 6).

Tabelle 5. *Wirkung von NAA + Adeninsulfat auf Stengelsegmente von Pelargonium zonale.* $T = 25^0$ C, *NL* = St. I, $p_H = 5$, Versuchsdauer 49 Tage

40	40	Adeningehalt mg/l
0,005	0,2	NAA-Gehalt mg/l
22	18	Zahl der Kulturen
21	17	Kallus aus d. Cambium
2	18	Kallus aus subep. Gewebe
16	—	Zahl der Wurzeln

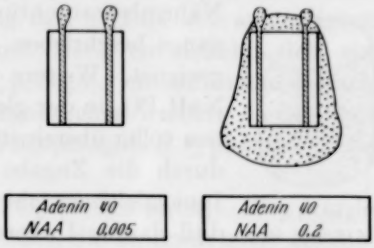


Abb. 12. Schema der Kallusbildung an Stengelsegmenten von *Pelargonium zonale* bei kombinierten Zusätzen von Adeninsulfat und NAA

Tabelle 6. *Wirkung von KH_2PO_4 + Adeninsulfat auf Stengelsegmente von Pelargonium zonale.* $T = 25^0$ C, *NL* = St. I, $p_H = 4$, Versuchsdauer 23 Tage

Kontr.	5	10	20	30	40	Adeningehalt mg/l	Kontr.	20	30	40
—	50	50	50	50	50	KH_2PO_4-Gehalt mg/l	—	100	100	100
34	31	36	31	32	23	Zahl der Kulturen	33	27	18	26
2	2	3	—	2	1	Ausfall durch Bakt.	3	3	1	2
32	29	32	31	30	22	Kallus aus d. Cambium	18	23	17	24

Das Ergebnis war bei allen Versuchsreihen das gleiche; zunächst setzte an allen Kulturen Kallusbildung aus dem Cambium ein, nach 2 Wochen begannen sich jedoch Kallus und Segment in charakteristischer

Weise braun zu färben. Nach drei Wochen schließlich waren einheitlich alle Versuchsansätze abgestorben und mußten weggeworfen werden. Die Braunfärbung der Segmente und das nachfolgende Absterben erfolgte dabei nicht gleichmäßig von einer Stelle ausgehend, sondern die Segmente teilten sich gewissermaßen in grüne und braune, d.h. lebende und tote Schichten auf, wie es Abb. 13 zeigt. Diese Reaktion der Kulturen war völlig überraschend, Standardnährlösung II, die 0,125 g(!) NaH_2PO_4 enthält — in diesem Versuch als Nährsubstrat natürlich nicht verwendet, — ist, wie eingangs beschrieben, gut für das Wachstum der Segmente geeignet. Weitere Versuche, die an Stelle von KH_2PO_4 NaH_2PO_4 in der gleichen Konzentration enthielten, brachten völlig übereinstimmende Ergebnisse. Es wird also wohl durch die Zugabe von 50 bzw. 100 mg/l KH_2PO_4 das Ionengleichgewicht der Nährlösung derart verschoben, daß daraus Unverträglichkeit für die Gewebe resultiert.

Abb. 13. KH_2PO_4 50 bzw. 100 mg/l

Nachdem sich Adenin in allen bisherigen Versuchen als negativ erwiesen hatte, wurden die Phosphatversuche an Stelle von Adenin auch mit Adenosin durchgeführt. Obwohl beim Tabak die beiden Verbindungen völlig gleichwertig erschienen waren, brauchte dies bei *Pelargonium zonale* nicht von vornherein angenommen zu werden. Es wurden daher gleichzeitig mit den Adeninversuchen auch noch folgende Reihen angesetzt: 1. Adenosin 20 mg/l und KH_2PO_4 100 mg/l (27 Kulturen). 2. Adenosin 30 mg/l und KH_2PO_4 100 mg/l (18 Kulturen). 3. Adenosin 40 mg/l und KH_2PO_4 100 mg/l (18 Kulturen). 4. Kontrollversuch sine Adenosin und 100 mg/l KH_2PO_4 (20 Kulturen).

Das Ergebnis war das gleiche wie bei den Adeninreihen. In den Kontrollen mit Phosphat allein wuchsen die Segmente überhaupt nicht an, sie starben nach einer Woche bereits ab. In den drei anderen Versuchsreihen mit Adenosin und Phosphat erfolgte wohl in den ersten zwei Wochen Kallusbildung, nach vier Wochen starben aber Kallus und Segmente unter Braunfärbung in der auch für Phosphatzusatz charakteristischen Weise ab. Adenin und Adenosin verhalten sich also bei *Pelargonium zonale* völlig gleich.

Auch durch Kombinationen von Adenin oder Adenosin mit erhöhten Phosphatgaben läßt sich demnach Sproßbildung an Segmenten von *Pelargonium zonale* nicht hervorrufen. Im Gegenteil, die Verbindung des kallus- und wurzelhemmenden Adenins mit Phosphat unterdrückt nicht nur die Ausbildung eines beständigen Kallus und die Anlegung von Wurzeln, sondern führt sogar zum Absterben der Kulturen.

Wie die beiden letzten Versuchsreihen zeigten, ist ein Zusatz von Phosphat zu Adenin oder Adenosin in bezug auf die Sproßbildung bei *Pelargonium zonale* unwirksam. Im Gegensatz zum Tabak kann das

Phosphat also bei *Pelargonium zonale* in dieser Hinsicht nicht als Antagonist zur NAA angesehen werden. Es könnte aber immerhin sein, daß das Phosphat bei *Pelargonium zonale* wenigstens als Antagonist zum Wuchsstoff in bezug auf dessen wurzelbildende Aktivität auftritt. Um die Bedeutung des Phosphates innerhalb dieses Reaktionssystems bei *Pelargonium zonale* zu untersuchen, wurden daher noch folgende Kulturreihen angesetzt:

1. 0,1 mg/l NAA und 50 mg/l KH_2PO_4 (12 Kulturen). Die Entwicklung der Segmente entsprach völlig den in Tabelle 1 aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten. Aus Cambium und Mark entwickelte sich ein kräftiger Kallus, dem 12,3 Wurzeln p. Segm. entstammten. Nach 23 Tagen mußte der Versuch jedoch abgebrochen werden, da die Segmente sich auch hier in der für die Phosphatgaben typischen Weise braun färbten und abstarben.

2. 0,2 mg/l NAA und 50 mg/l KH_2PO_4 (20 Kulturen). Hier wurde reichlich Kallus aus dem Cambium gebildet, die zu erwartende Kallusbildung aus subepidermalen Zellen konnte jedoch nicht mehr beobachtet werden, da auch dieser Versuch nach 23 Tagen wegen Absterbens der Kulturen beendet werden mußte.

3. Kontrollversuch, 0,1 mg/l NAA sine Phosphat (17 Kulturen). An allen Segmenten bildete sich reichlich Kallus aus Cambium und Mark aus, insgesamt wurden 12,1 Wurzeln p. Segm. gebildet (vgl. Tabelle 7).

Entsprechende Versuche, die einen Zusatz von 100 mg/l KH_2PO_4 enthielten, ergaben völlig übereinstimmende Ergebnisse.

1. 0,1 mg/l NAA und 100 mg/l KH_2PO_4 (13 Kulturen). Aus cambialem Kallus entstanden 11,9 Wurzeln p. Segm. Der Versuch wurde am 23. Tage abgebrochen, denn auch hier starben die Segmente vorzeitig ab.

2. 0,2 mg/l NAA und 100 mg/l KH_2PO_4 (20 Kulturen). Der aus dem Cambium gebildete Kallus, dem keine Wurzeln entsprangen, färbte sich nach 23 Tagen braun und starb ab.

3. Kontrollversuch 0,2 mg/l NAA sine Phosphat (18 Kulturen). Die cambiale Kallusbildung ging nach drei Wochen zurück und wurde von einer Kallusbildung aus subepidermalem Gewebe abgelöst.

Tabelle 7. *Wirkung von NAA + KH_2PO_4 auf Stengelsegmente von Pelargonium zonale.* $T = 25°$ C, $NL =$ St. I, $p_H = 6$, Versuchsdauer 23 Tage

0,1 Kontr.	0,1	0,2	NAA-Gehalt mg/l	0,2 Kontr.	0,1	0,2
—	50	50	KH_2PO_4-Gehalt mg/l	—	100	100
20	17	26	Zahl der Kulturen	20	20	22
3	5	6	Ausfall durch Bakt.	2	7	2
15	10	20	Kallus aus d. Cambium	18	11	20
8	6	—	Wurzelbildende Kulturen	—	6	—
206	136	—	Gebildete Wurzeln	—	155	—
12,1	12,3	—	Wurzeln pro Segment	—	11,9	—

Zusammenfassend kann — wie auch Tabelle 7 zeigt — gesagt werden, daß erhöhte Phosphatzusätze *keine* Änderung der in Tabelle 2 aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten der Wurzelbildung hervorrufen. Auch die Kallusbildung weist keinerlei Beeinflussung durch das Phosphat auf. Dagegen zeigt sich erneut die Unverträglichkeit des Phosphats für *Pelargonium zonale*, indem alle Kulturen nach 23 Tagen abgestorben waren, unabhängig von dem bis dahin erreichten Entwicklungszustand.

Nachdem alle Versuche fehlgeschlagen waren, durch Adenin oder Adenosin unter Zugabe von NAA oder Phosphat an Pelargonienstengeln eine Sproßbildung zu erreichen, wurden versuchsweise auch noch eine ganze Reihe weiterer Extrakte in ihrer Wirkung auf *Pelargonium zonale* untersucht.

1. Extract aus Faex medicinalis, hergestellt nach P. R. WHITE (1937) 20 Kulturen.

2. Extract aus Bäckerhefe, hergestellt nach R. J. GAUTHERET 22 Kulturen.

3. Extract aus Bierhefe, hergestellt nach R. J. GAUTHERET 18 Kulturen.

4. Extract aus *Pelargonium*-Blattstielen in Anlehnung an den von S. C. WIGGANS verwendeten Preßsaft der Blätter von *Daucus carota* zur Aufzucht von Kalluskulturen von *Daucus*. 50 Pelargonienblattstiele wurden einen Tag lang mit Äther extrahiert, nach Abzug des Äthers der Rückstand mit Wasser aufgenommen (100 cm^3), davon 10 cm^3 der Nährlösung zugesetzt. — 32 Kulturen.

5. Extract aus Pelargonien-Sproßspitzen. Methode siehe 4. — 38 Kulturen.

6. Je 100 g einer frisch geriebenen Meerrettichwurzel wurden extrahiert: a) mit kaltem Wasser, 10 Kulturen, b) mit heißem Wasser, 12 Kulturen, c) mit Alkohol, 10 Kulturen, d) mit Äther, 15 Kulturen, e) mit Aceton, 10 Kulturen. Äther, Alkohol und Aceton wurden durch Destillation abgezogen, der Rückstand mit 100 cm^3 Aqua dest. aufgenommen und 10 cm^3 der Nährlösung zugesetzt.

Ammoniumnitrat, Arginin und Nicotinsäure sind Verbindungen, denen von F. SKOOG (1953) allgemein wachstumsstimulierende Eigenschaften an Tabakstengelsegmenten zugeschrieben werden. Sie haben zwar beim Tabak keine organneubildende Aktivität, doch erhöht z. B. Ammoniumnitrat in Kombination mit Adenin und verwandten Substanzen die Zahl der Sprosse. Eingehende Versuchsergebnisse über Experimente mit diesen drei Verbindungen finden sich jedoch bei keinem Autor, daher wurden versuchsweise folgende Kulturreihen angesetzt:

7. Ammoniumnitrat 100 mg/l, Guanin 80 mg/l, Arginin-HCl 100 mg/l, 13 Kulturen.

8. Ammoniumnitrat 100 mg/l, 16 Kulturen.

9. Nicotinsäure 50 mg/l, 10 Kulturen.
10. Ammoniumnitrat 100 mg/l, Guanin 80 mg/l, 10 Kulturen.

In keinem einzigen Falle konnte durch die 10 genannten Zusätze eine bessere Kallusbildung oder erhöhte Wurzelbildung oder Sproßbildung beobachtet werden.

Der Schluß, daß es bei *Pelargonium zonale* mit Hilfe der hier verwendeten chemischen Verbindungen nicht möglich ist, Sproßbildung hervorzurufen, wird nicht durch die Tatsache entkräftet, daß unter den insgesamt 2700 Versuchsansätzen 13mal die Ausbildung von kräftigen Sprossen beobachtet werden konnte. Ganz offensichtlich sind diese aus bereits vorhandenen Anlagen hervorgegangen, keinesfalls handelt es sich um eine Neuanlegung. Neun dieser Sprosse vertrockneten nach 3 Wochen, in 2 Fällen bildeten sich unmittelbar unter dem Sproß Wurzeln aus, hier wuchsen die Anlagen zu normalen beblätterten Trieben weiter. Die gleichen Beobachtungen konnten von F. Skoog (1948) an Tabakstengelsegmenten gemacht werden. Die restlichen 2 Kulturen aber bildeten auch *ohne* sichtbare Wurzeln, allerdings erst nach 3—4 Wochen, normale Blätter aus. Dies stimmt wieder mit Versuchen überein, die C. E. Henrickson (1954) bei der Aufzucht von Sonnenblumenexplantaten anstellte. Er konnte hierbei in einem Fall einen Sproß beobachten, der sich ohne sichtbare Wurzeln normal weiterentwickelte.

B. Cyclamen persicum

Material und Methode

Als Versuchsmaterial fanden voll ausgewachsene einjährige Knollen von *Cyclamen persicum* Verwendung, die freundlicherweise von der Großgärtnerei Robert Mayer, Bamberg, zur Verfügung gestellt wurden. Bis zur Benutzung lagen die Knollen zwischen leicht angefeuchtetem Torfmull.

Vor der eigentlichen Desinfektion wurden die Knollen zunächst mit lauwarmem Wasser gründlich gereinigt, alle vorhandenen Wurzeln abgeschnitten, Sproß- und Wurzelanlagen entfernt und die Korkschicht abgeschabt.

Auf der Suche nach einem geeigneten Desinfektionsmittel wurden die schon bei *Pelargonium zonale* angegebenen Agentien ausprobiert; dabei zeigte es sich, daß bei Cyclamenknollen wesentlich stärkere Sterilisationsmethoden angewendet werden können, ohne daß die Gewebe dadurch abgetötet werden. Auch sind die Knollen infolge der unterirdischen Lage in hohem Maße von Bakterien befallen, weit mehr als die oberirdischen Pelargoniumstengel, und es bedarf ohnehin wirkungsvollerer Desinfektionsmethoden, um bakterienfreie Kulturen herzustellen. Natriumhypochloritlösung, die bei *Pelargonium zonale* sehr gut

geeignet war, reichte hier nicht mehr aus. Erst nach vielen Fehlschlägen gelang es, keimfreie Versuchsansätze auf folgende Weise zu erhalten: Die geschälten Knollen wurden *eine Nacht* lang in Sublimatlösung 0,02% eingelegt. Der Prozentsatz der von Pilzen oder Bakterien befallenen Kulturen wurde dadurch auf 15—20% herabgedrückt (bei *Pelargonium zonale* wirkte schon Einlegen in $HgCl_2$ 0,01%, 15 min lang, toxisch). Trotzdem fiel auch bei dieser Methode hin und wieder ein ganzer Ansatz aus; offensichtlich war dann eine einzige Knolle so stark mit Bakterien verseucht gewesen, daß diese selbst der starken $HgCl_2$-Lösung widerstanden. Insgesamt konnten jedoch durch die angegebene Methode rund 1500 sterile Kulturen gezüchtet werden und die Sterilisation mit der $HgCl_2$-Lösung erwies sich als die bestmögliche.

Das Sterilisieren der geschälten Knollen in $HgCl_2$-Lösung erforderte keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen, das Aufteilen der Knollen und Einlegen der fertig zugerichteten Stücke mußte dagegen wieder unter sorgfältiger Einhaltung aller bei *Pelargonium zonale* geschilderten Maßnahmen in der Impfkabine erfolgen. Auf einer sterilen Petrischale wurde die durch $HgCl_2$-Lösung sterilisierte und *nicht* mit Aqua steril. nachgewaschene Knolle zunächst mit einem Skalpell in vier Teile zerschnitten. Von jedem dieser Teile wurde dann die äußere Schicht so weit entfernt, daß nur parenchymatisches Gewebe übrigblieb, die peripheren Leitbündel wurden völlig abgetrennt. Dabei fielen automatisch auch alle durch das Sterilisationsmittel abgetöteten Zellschichten fort; diese waren daran leicht kenntlich, daß sie weißlich und bröcklig aussahen, während die intakten Gewebe eine rötliche Farbe zeigten. Die Grenze zwischen abgetöteten und lebenden Zellen ist sehr ausgeprägt. Unter den angegebenen Umständen ist es klar, daß sich das sonst übliche Nachwaschen mit Aqua steril. erübrigt, denn die äußeren Schichten, die dadurch gereinigt würden, werden ja im zuletzt beschriebenen Arbeitsgang ohnehin weggeschnitten.

Die verbleibenden Knollenstücke wurden nun in würfelförmige Segmente von d $8 \times 8 \times 8$ mm zerteilt; dabei mußte darauf geachtet werden, daß die morphologische Unterseite des Segmentes nach oben gerichtet war. Durch einen Tuschepunkt ließen sich Verwechslungen leicht vermeiden. Die durchschnittliche Anzahl der so erhaltenen Segmente betrug je nach Größe der Knolle etwa 70—100.

Die Nährböden wurden in der bei *Pelargonium zonale* beschriebenen Weise zubereitet; es zeigte sich, daß auch für Knollensegmente von *Cyclamen persicum* die Nährlösung St. I ausgezeichnet geeignet war, doch wuchsen die Segmente auch auf St. II. An Stelle von Cystein oder Glykokoll wurde jedoch Arginin verwendet, dem F. SKOOG (1948) einen allgemeinen wachstumsstimulierenden Effekt zuschreibt.

Aufbewahrung und Temperaturverhältnisse entsprachen den bei *Pelargonium zonale* angegebenen Bedingungen, ebenso die p_H-Einstellung.

3—4 Tage nach dem Einlegen trockneten die Segmente ab, d.h. die Oberfläche, die zuerst stets etwas feucht ist, zeigte keinerlei Flüssigkeitsspuren mehr. Das war bei allen Kulturen außerordentlich wichtig. Denn wenn die Segmente durch mangelnde Luftversorgung oder durch nicht genügend gelierten Nährboden feucht blieben, setzte nach kurzer Zeit Nekrose und Absterben ein. Dann erfolgte zunächst keinerlei Wachstum, sondern die Stücke machten eine Ruheperiode durch, während deren sich lediglich eine mehr oder weniger dicke Korkschicht ausbildete. Erst nach 6—7 Wochen begann die eigentliche Reaktion. Die gesamte Laufzeit der Versuche betrug maximal 80—100 Tage, da sowohl Sproß- als auch Wurzelbildung verhältnismäßig langsam vor sich ging. Nach Ablauf dieser Zeit waren die Segmente jedoch nicht abgestorben, lediglich die Nährlösung begann sich zu verfärben und von den Wänden der Reagenzgläser abzulösen.

Außer durch die Art der Reaktion unterscheiden sich die Cyclamenstücke auch durch den Ort der Reaktion wesentlich von *Pelargonium zonale*. Während nämlich bei *Pelargonium zonale* durch den Bau des Stengels von vornherein die beiden Querschnittsflächen der Stengeloberfläche gegenüberstehen, sind die Gewebestücke von *Cyclamen* aus dem Parenchym der Knolle herausgeschnitten und die 6 Flächen des Würfels einander mehr oder weniger gleichwertig. Tatsächlich waren sie auch in ihrer Reaktionsweise nicht zu unterscheiden. Wie alle Versuche zeigten, treten Neubildungen von Organen nicht an einer bestimmten Stelle des Segmentes auf, sondern verteilen sich regellos über die gesamte Oberfläche des Würfels. Obwohl es sich durch diese Tatsache eigentlich erübrigt hätte, die Segmente beim Einlegen mit der morphologischen Oberseite nach unten zu placieren, wurde doch aus Gründen der Einheitlichkeit nicht davon Abstand genommen.

Ergebnisse

Zunächst wurde auch hier wieder untersucht, welchen Einfluß der Zusatz von NAA zur Nährlösung hat. Folgende Konzentrationen NAA wurden auf ihre Wirksamkeit getestet: 0,005, 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0 mg/l NAA. Die Reaktion der Kulturen auf diese Zusätze war außerordentlich charakteristisch, aber in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration NAA sehr unterschiedlich.

1. Durch NAA-Gaben von 0,005—0,2 mg/l wurde Sproßbildung hervorgerufen, die mit steigendem NAA-Gehalt abnahm.

2. NAA in Konzentration von 0,4—5,0 mg/l verursachte in ansteigendem Verhältnis Wurzelbildung.

3. Bei 2,0 mg/l NAA setzte Kallusbildung ein, die sich rasch steigerte und in den Versuchen mit 10 mg/l NAA eine optimale Ausbildung aufwies.

Die gleichzeitig bei dieser Konzentration auftretenden Wurzeln erfuhren ebenfalls eine Abänderung in dem Sinne, daß sich ihre durchschnittliche Länge und Dicke verringerte.

Im einzelnen hatten die verschiedenen Kulturansätze folgende Ergebnisse:

1. NAA 0,005 mg/l (36 Kulturen). Zunächst machten die Segmente eine 8wöchige Ruheperiode durch, während deren sie sich mit einer Korkschicht überzogen. Ihre würfelförmige Gestalt erfuhr jedoch keine merkbare Veränderung, lediglich die Ränder sanken leicht ein. Dann entstanden auf der Oberfläche des Segmentes Sprosse, und zwar dergestalt, daß sich in der Korkschicht zunächst Risse von der Länge 0,3—0,5 mm bildeten, aus denen die jungen Sprosse hervorbrachen.

Längsschnitte durch ein sproßtragendes Segment zeigten, daß sich an den Rändern des Segmentes — eine Zellreihe unterhalb der Schnittfläche — ein Cambium ausgebildet hatte, das nach außen eine 7 bis 10 Zellreihen dicke Korkschicht abgab. Unmittelbar unter diesem Cambium aber wurde in den nun anschließenden Parenchymzellen lebhafte Teilungstätigkeit beobachtet, die allerdings nicht zu einem ebenso geregelten Cambium führte. Vielmehr machten die großen, polygonalen Zellen, die durch 2—3 Querwände unterteilt waren, den Eindruck von Etagenkork. In diesem Gewebe fand nun fortschreitend die Differenzierung der Leitungselemente des jungen Sprosses statt. Zunächst wurden polygonale, stark getüpfelte, noch verstreut liegende Zellen beobachtet, die sich mehr und mehr häuften, um schließlich zusammenhängende Leitbündel zu bilden. Wenn an der Oberfläche beobachtet werden konnte, daß sich die jungen Sprosse direkt aus Rissen in der Korkschicht entwickelten, so stimmt dies mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung überein. Der Vegetationspunkt des jungen Sprosses wird unmittelbar unter dem Korkcambium angelegt, die mit dieser intensiven Teilungstätigkeit in Zusammenhang stehende starke Volumenvergrößerung führt dann zwangsläufig zu einem Aufreißen der Korkschicht, die ja das erste Anzeichen einer Sproßbildung darstellt.

Die jungen Sprosse hatten zunächst die Form kleiner weißer Kügelchen, später färbten sie sich hellgrün, dann grauviolett. Nach etwa 100 Tagen hatten sich an ihnen meistens kleine, etwa 1 cm große Blättchen entwickelt (Abb. 14).

An den 36 Kulturen entstanden insgesamt 180 Sprosse = 5,0 p. Segm. An zwei Versuchsansätzen wurde gleichzeitig das Auftreten je einer Wurzel beobachtet, doch entwickelten sich diese Kulturen in der Folgezeit

nicht schneller als diejenigen ohne Wurzeln. Von den in den späteren Reihen gebildeten Wurzeln unterscheiden sich die hier auftretenden durch größere Länge (5—7 cm) und geringere Dicke (0,2 cm).

2. NAA 0,01 mg/l (37 Kulturen). An allen Ansätzen bildeten sich in der schon beschriebenen Weise Sprosse aus, insgesamt entstanden 115 = 3,1 p. Segm. Eine Kultur entwickelte zusätzlich noch 1 Wurzel, die wiederum lang und dünn war. Das Aussehen der Kulturen entsprach Abb. 14.

3. NAA 0,02 mg/l (32 Kulturen). An allen Segmenten bildeten sich Sprosse aus (105 = 3,3 p. Segm.), an 2 Kulturen wurde gleichzeitig je 1 Wurzel gebildet. Die Beschaffenheit der Wurzeln und Sprosse entsprach völlig Abb. 14.

4. NAA 0,1 mg/l (17 Kulturen). Die Sproßbildung blieb mit 1,1 p. Segm. wesentlich hinter den in den Reihen 1, 2 und 3 erreichten Werten zurück. Wurzeln wurden nicht beobachtet. Auch hier entsprach der Habitus der jungen Sprosse der unter 1. gegebenen Beschreibung.

5. NAA 0,2 mg/l (28 Kulturen). Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen setzte bei dieser Konzentration die Sproßbildung auffallend spät, nämlich erst nach 9 Wochen, ein, wobei die Durchschnittszahl der gebildeten Sprosse mit 1,2 p. Segm. mit der der vorangegangenen Reihe ungefähr übereinstimmte. Eine Wurzel trat an einem Segment auf, das vorher bereits einen Sproß ausgebildet hatte.

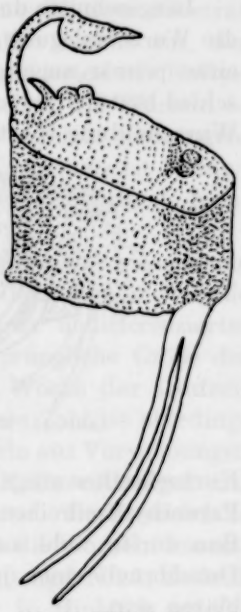


Abb. 14. NNA 0,005 mg/l

Da die Segmente erst sehr spät und langsam reagierten und das Ergebnis so wenig von dem der vorhergehenden Reihe abwich, wurde der Versuch wiederholt. Er hatte genau das gleiche Resultat: Auch hier setzte die Sproßbildung erst nach 9 Wochen ein, dabei bildeten die 30 Kulturen 31 Sprosse aus = 1,0 p. Segm., an einer Kultur entwickelte sich außerdem eine Wurzel.

6. NAA 0,4 mg/l (21 Kulturen). Hier überschreitet die NAA-Gabe offensichtlich einen kritischen Punkt: Es traten nämlich an keiner Kultur Sprosse auf, einige Segmente zeigten sogar — was bisher nicht der Fall gewesen war — überhaupt keinerlei Organbildung. Erst verhältnismäßig spät, nach 10 Wochen, entwickelten sich 14 Wurzeln. Diese Wurzeln entstanden auf folgende Weise: Das würfelförmige Segment, das in den ersten 8 Wochen eine Korkschicht ausgebildet hatte, begann sich plötzlich an einer, vorher völlig indifferent aussehenden Stelle vorzuwölben. Diese Wölbung, durchschnittlich vom Durchmesser $d = 3$ mm, nahm zunächst im Vergleich zum übrigen braunen

Korkgewebe eine hellere Färbung an, wurde mit zunehmendem Wachstum schließlich weiß und endlich brach die junge Wurzel hervor. Die in dieser Versuchsreihe entstandenen Wurzeln hatten einen Durchmesser von $d = 3$—4 mm und eine Länge $l = 2$—3 cm, unterschieden sich also rein äußerlich von den in den vorherigen Reihen gelegentlich beobachteten Wurzeln.

Längsschnitte durch ein wurzeltragendes Segment zeigten, daß auch die Wurzelanlegung in gleicher Weise wie die Sproßanlegung unterhalb eines primär angelegten Cambiums erfolgte. Ein wesentlicher Unterschied bestand jedoch darin, daß bei Zusatz hoher NAA-Gaben, die zur Wurzelbildung führten, vom Cambium nach außen wesentlich weniger

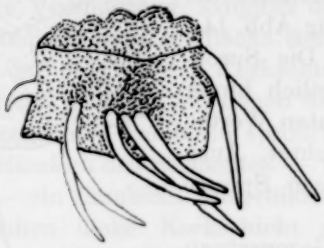


Abb. 15. NAA 1,0 mg/l

Abb. 16. NAA 1,5 mg/l

Korkzellreihen ausgebildet wurden, während die nach innen abgegebenen Parenchymzellreihen sehr zahlreich waren. Durch diesen andersartigen Bau dürfte wohl auch die Verschiedenheit des äußeren Bildes beim Durchbruch einer jungen Wurzel und eines jungen Sprosses zu erklären sein.

7. NAA 0,8 mg/l (15 Kulturen). Auch hier setzte die Organbildung erst nach 9 Wochen ein, es wurden jedoch 31 Wurzeln = 2,1 p. Segm. in der eben beschriebenen Art und Form gebildet.

8. NAA 1,0 mg/l (16 Kulturen). Zunächst fiel an diesen Versuchen auf, daß die Korkschicht nicht mehr so stark ausgebildet war wie in den bisherigen Kulturansätzen. Dagegen setzte die Wurzelbildung bereits nach 6 Wochen ein und erreichte eine Durchschnittszahl von 3,9 p. Segm. (Abb. 15).

9. NAA 1,5 mg/l (36 Kulturen). Die Korkschicht war an allen Segmenten entweder sehr schwach ausgebildet oder fehlte stellenweise ganz. Mit dem Verschwinden der Korkschicht setzte schlagartig eine starke Wurzelbildung ein, 220 Wurzeln = 6,1 p. Segm. wurden gezählt (Abb. 16).

10. NAA 2,0 mg/l (33 Kulturen). Hier bildete sich keine Korkschicht mehr an den Segmenten, an ihrer Stelle überzog sich die Oberfläche teilweise mit einer dünnen Schicht blasenförmiger, undifferenzierter Kalluszellen. Mit der Organ-, in diesem Falle Wurzelbildung, stand

diese Kallusbildung jedoch nicht in dem bei *Pelargonium zonale* beobachteten Zusammenhang. Die entstehenden 210 Wurzeln standen in keiner unmittelbaren Beziehung zum Kallus, sondern entwickelten sich auch — unabhängig davon — an jeder beliebigen Stelle des Segmentes.

11. NAA 3,0 mg/l (23 Kulturen). Bereits nach 3 Wochen bildeten die Segmente auf der Oberfläche — mit Ausnahme der dem Substrat aufliegenden morphologischen Oberseite — reichlich Kallus aus, der das Segment förmlich auftrieb. Zwei Kulturen produzierten *nur* Kallus, an den übrigen entstanden daneben nach 5 Wochen 217 Wurzeln = 9,1 p. Segm., die sehr rasch wuchsen und tief in das Substrat eindrangen. In bezug auf Ausbildung und Schnelligkeit des Wachstums ist 3,0 mg/l NAA für die Wurzelbildung an Cyclamensegmenten die optimale Konzentration.

12. NAA 4,0 mg/l (18 Kulturen). Die nach 3 Wochen einsetzende Kallusbildung, die außer der dem Substrat aufliegenden Seite alle Flächen des Würfels mit einer mächtigen Schicht undifferenzierter Kallusmassen überzieht, ist so stark, daß die ursprüngliche Größe des Segmentes nahezu verdoppelt wird. Von der 5. Woche der Laufzeit der Kulturen ab bilden sich 208 Wurzeln aus. Diese Zahl ist allerdings eher zu niedrig als zu hoch, da auch hier die Wurzeln aus Vorwölbungen entstanden und deshalb in einem frühen Stadium Kalluswölbungen und Wurzelwölbungen oft nicht zu unterscheiden waren. Im Zweifelsfalle wurden sie nicht als Wurzel gezählt. Jedoch waren die Wurzeln wesentlich dünner und kürzer als in den Reihen 0,4—3,0 mg/l NAA, deshalb ist die Durchschnittszahl von 11,5 p. Segm. zwar in Hinblick auf die Zahl der neuangelegten Wurzeln als Maximum anzusprechen, in bezug auf Form und Wachstumsschnelligkeit ist das Optimum jedoch bereits überschritten. An 3 Kulturen wurde nur Kallus gebildet.

13. NAA 5,0 mg/l (23 Kulturen). Nach 10 Tagen setzte starke Kallusbildung ein, so daß die ursprüngliche Größe des Segmentes mehr als verdoppelt wurde. Durch die starke Vergrößerung der Oberfläche rissen die äußersten Zellschichten der Kallusmassen stellenweise ein. Auch hier wurden 269 Wurzeln = 11,6 p. Segm. gebildet, die jedoch verhältnismäßig kurz und dünn waren und nur langsam in das Substrat hineinwuchsen.

14. NAA 10,0 mg/l (11 Kulturen). In dieser Versuchsreihe erfährt der Kallus seine maximale Ausbildung. Alle Kulturen entwickeln an der Oberfläche — mit Ausnahme der morphologischen Oberseite — mächtige Kallusmassen, die wiederum an den äußeren Zellschichten einreißen, so daß die Segmente ein zerklüftetes Aussehen hatten. Die 40 = 3,6 p. Segm. noch entstehenden Wurzeln sind sehr kurz und dünn (Abb. 17).

15. Kontrolle (27 Kulturen). 26 Kulturen zeigten noch nach 10 Wochen keine Veränderung. Alle Versuchsansätze überzogen sich mit einer dicken Korkschicht, nur ein Segment bildete 1 Sproß in der bei NAA 0,005 mg/l beschriebenen Weise aus.

Im Laufe der Arbeit hatte sich herausgestellt, daß von Kulturen mit Bakterienbefall, der in den ersten 2—3 Tagen erkannt wurde, zumindest die Nährlösung wieder verwendet werden kann, wenn man das Segment entfernt und das Substrat sofort bei $^1/_2$ Atm. 20 min sterilisiert. Nachdem in diese nun wieder keimfreien Lösungen erneut Knollensegmente eingelegt worden waren, zeigte es sich aber, daß die aus diesen Versuchen gewonnenen Ergebnisse von den übrigen der gleichen Reihe teilweise abwichen. Handelte es sich um Nährböden, die mit Adenin oder kleinen Mengen NAA (bis zu 0,2 mg/l) versetzt waren, so trat die zu erwartende Sproßbildung — auch quantitativ übereinstimmend — auf. Nährlösungen mit NAA-Konzentrationen von 0,4—1,5 mg/l aber wurden durch die 2. Sterilisation offensichtlich verändert, denn die Kulturen brachten in diesen Fällen keine Wurzeln mehr hervor — wie zu erwarten gewesen wäre —, sondern wiederum Sprosse. Bei hohen NAA-Gaben dagegen (1,5—10 mg/l) produzierten die Segmente auch auf nachsterilisierten Böden Wurzeln.

Abb. 17.
NAA 10,0 mg/l

Offenbar wird bei der erneuten Sterilisation ein gewisser Prozentsatz der NAA inaktiviert. Enthält der Nährboden mittlere Mengen NAA, die an sich schon Wurzelbildung auslösen (0,4—1,5 mg/l), so reichen die aktiv bleibenden Gaben NAA nicht mehr aus, um die Wurzelbildung anzuregen, sondern wirken sich — wie Konzentrationen bis zu 0,2 mg/l — sproßfördernd aus. War aber die ursprünglich im Substrat vorhandene Menge NAA groß (1,5—10 mg/l), so bleibt selbst nach Inaktivierung eines gewissen Teiles immer noch genügend Wuchsstoff in der Nährlösung, um Wurzelbildung hervorzurufen.

Um jedoch Irrtümer zu vermeiden, wurden alle Kulturen, die auf nachsterilisierten Böden wuchsen, gesondert gezählt und in den Kurven und Tabellen nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend ergibt sich also, daß Knollensegmente von *Cyclamen persicum* auf die Zugabe verschiedener Mengen NAA sehr spezifisch ansprechen. Die NAA kann bei *Cyclamen persicum* sowohl Sproß- als auch Wurzel- oder Kallusbildung auslösen, je nachdem in welcher Konzentration sie der Nährlösung zugesetzt wird. Während sich aber die Sproß- und Wurzelbildung innerhalb der einzelnen Versuchsreihen nicht überschneiden, schließt die Kallusbildung die Wurzelbildung in den Reihen 2,0—10,0 mg/l NAA nicht aus. In dem Maße, wie die Kallusbildung wächst, nimmt jedoch die Wurzelbildung — wenn

auch zunächst nicht an Zahl der Neuanlegungen, so doch an Größe und Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Wurzeln — ab.

Die Tatsache, daß in den Kontrollen an 27 Versuchsansätzen immerhin 1 Sproß gebildet wird, zeigt, daß die Segmente in geringem Maße auch *ohne* Zusatz von Wuchsstoffen zur Sproßbildung befähigt sind.

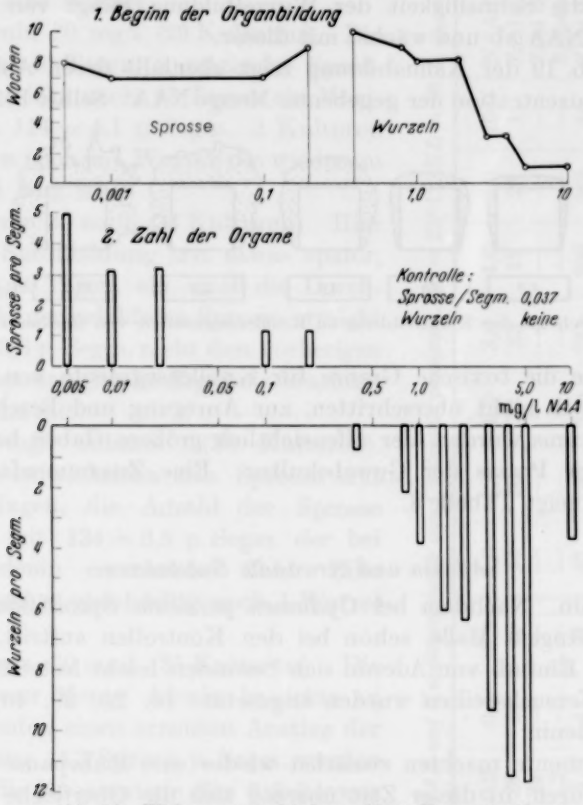


Abb. 18. Wirkung verschiedener NAA-Konzentrationen auf Knollensegmente von *Cyclamen persicum*

Wenn aber nach Zugabe von 0,005 mg/l NAA die Sproßbildung schlagartig von 0,004 p. Segm. auf 5,0 p. Segm. ansteigt, so ist das ein Beweis dafür, daß der Wuchsstoff in diesem Reaktionssystem ein ganz wesentlicher Faktor ist.

Auffallend ist ferner, daß innerhalb der einzelnen Versuchsreihen nicht wie bei *Pelargonium* nur ein bestimmter Prozentsatz der Kulturen reagierte, sondern praktisch an allen Segmenten Organbildungen zu beobachten waren. Eine Ausnahme bildeten lediglich die Kontrollen und die Versuchsreihen mit Zusatz von 0,4 mg/l NAA, letztere stellt offensichtlich eine Grenzkonzentration zwischen Sproß- und Wurzel-

bildung dar. Entscheidend bleibt aber die Tatsache, daß *nur* die Variation des Wuchsstoffes der determinierende Faktor zur Sproß-, Wurzel- oder Kallusbildung war.

Die Abb. 18 veranschaulicht die Sproß- und Wurzelbildung in Abhängigkeit von der Zeit. Sprosse erscheinen ziemlich konstant nach 50 Tagen, die Schnelligkeit der Wurzelbildung hängt von der Konzentration NAA ab und wächst mit dieser.

Die Abb. 19 der Kallusbildung zeigt ebenfalls deren Abhängigkeit von der Konzentration der gegebenen Menge NAA. Selbst bei 10,0 mg/l

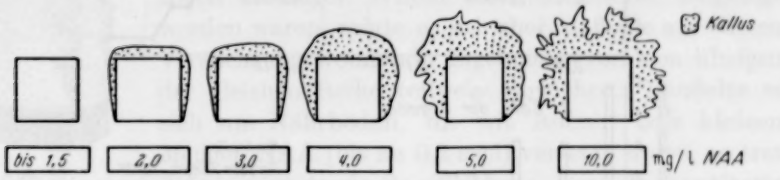


Abb. 19. Schema der Kallusbildung an Knollensegmenten von *Cyclamen persicum*

NAA wurde die toxische Grenze für Knollensegmente von *Cyclamen persicum* noch nicht überschritten, zur Anregung und Beschleunigung des Wachstums wurden hier offensichtlich größere Gaben benötigt als sonst in der Praxis der Gewebekultur. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 8.

Adenin und verwandte Substanzen

I. Adenin. Nachdem bei *Cyclamen persicum* Sproßbildung, wenn auch in geringem Maße, schon bei den Kontrollen auftritt, muß ein eventueller Einfluß von Adenin sich besonders leicht feststellen lassen. Folgende Versuchsreihen wurden angesetzt: 10, 20, 30, 40, 50, 120, 200 mg/l Adenin.

Die Segmente machten zunächst wieder eine Ruhepause von etwa 50 Tagen durch, in dieser Zeit überzog sich die Oberfläche mit einer verhältnismäßig dicken Korkschicht. Diese war in *allen* Versuchsreihen gleichmäßig stark ausgebildet und fehlte in keinem Fall. Alle Segmente hatten bei Ende des Versuches ihre ursprüngliche Form, Kallusbildungen konnten nicht beobachtet werden, Wurzelbildung *allein* trat ebenfalls nicht auf, sondern die Wurzeln entstanden nur an Segmenten, die schon Sprosse entwickelt hatten. Alle entstandenen Wurzeln waren dünn und wuchsen tief in das Substrat hinein, die Sprosse bildeten sich auch hier aus Rissen in der Korkschicht in der bei den Versuchen mit NAA angegebenen Weise.

1. Kontrollversuch (37 Kulturen). Unregelmäßig auf alle Seiten des Würfels verteilt entstanden nach Ablauf von 50 Tagen 1,4 Sprosse p. Segm.

2. Adenin 10 mg/l (36 Kulturen). Durch die Zugabe von Adenin wird die Sproßbildung an den Segmenten schlagartig verdreifacht. Es bilden sich 127 Sprosse = 3,7 p. Segm. aus, an einem Segment entstand zusätzlich eine Wurzel.

3. Adenin 20 mg/l (29 Kulturen). Die nach etwa 40 Tagen einsetzende Sproßbildung erreicht nach 80 Tagen ein Maximum von 114 = 4,1 p. Segm. 2 Kulturen produzieren noch je 1 Wurzel, die wiederum dünn und lang ist.

4. Adenin 30 mg/l (34 Kulturen). Hier setzte die Sproßbildung erst etwas später, nach etwa 60 Tagen, ein, auch die Durchschnittszahl der gebildeten Sprosse erreicht mit 105 = 3,5 p. Segm. nicht den vorherigen Stand. Fast das gleiche Ergebnis brachten die Versuche mit:

5. 40 mg/l Adenin (38 Kulturen). Auch hier entwickelten sich Sprosse erst nach 60 Tagen, die Anzahl der Sprosse entsprach mit 134 = 3,5 p. Segm. der bei 30 mg/l Adenin errechneten Zahl. Eine Kultur brachte gleichzeitig noch 1 Wurzel hervor.

6. Adenin 50 mg/l (35 Kulturen). Die Zugabe dieser Menge Adenin bewirkte an den Segmenten einen erneuten Anstieg der Sproßbildung. 4,3 Sprosse p. Segm. wurden gebildet, die Ruheperiode der Stücke war hier auf nur 40 Tage beschränkt.

7. Adenin 120 mg/l (24 Kulturen). Die zunehmende Förderung der Sproßbildung machte sich hier auch dadurch bemerkbar, daß diese bereits nach 30 Tagen einsetzte und zu der maximalen Ausbildung von 157 Sprossen = 6,5 p. Segm. führte. Im Vergleich mit den Kontrollversuchen werden also bei Zugabe von 120 mg/l Adenin 5mal soviel Sprosse gebildet, und die Zeit bis zum Erscheinen derselben wird fast bis auf die Hälfte verkürzt (Abb. 20).

Tabelle 8. *Wirkung von NAA auf Knollensegmente von Cyclamen persicum.* $T = 25^0$ C, NL = St. I, $p_H = 5$

NAA-Gehalt mg/l	Kontr.	0,005	0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,8	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	10,0
Zahl der Kulturen	27	36	37	32	17	28	21	15	16	36	33	23	18	23	11
Zahl der Sprosse	1	180	115	105	19	34	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sprosse pro Segment	0,04	5,0	3,1	3,3	1,1	1,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zahl der Wurzeln	—	3	1	2	—	1	14	31	57	220	210	217	208	269	40
Wurzeln pro Segm.	—	0,08	0,02	0,03	—	—	0,67	2,1	3,9	6,1	6,4	9,4	11,5	11,6	3,6
Sprosse + Wurzeln	—	2	—	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Versuchsdauer	7.7. bis 28.9.	20.4. bis 25.7.	30.4. bis 25.7.	30.4. bis 25.7.	30.4. bis 25.7.	21.4. bis 25.7.	11.5. bis 25.7.	10.5. bis 25.7.	10.5. bis 25.7.	17.5. bis 25.7.	17.5. bis 25.7.	18.6. bis 28.9.	18.6. bis 28.9.	7.7. bis 28.9.	7.7. bis 28.9.

8. Adenin 200 mg/l (30 Kulturen). Eine Zugabe dieser Menge Adenin wirkt sich auf die Kulturen toxisch aus. Bereits nach 10 Tagen waren alle Segmente zusammengeschrumpft und abgestorben, die Nährlösung färbte sich an der Stelle, wo das Segment dem Substrat auflag, tiefrotviolett.

Abb. 20.
Adeninsulfat 120 mg/l

Zusammenfassend haben wir folgende Versuchsergebnisse zu nennen (Tabelle 9): Durch Zugabe von Adeninsulfat zur Nährlösung wird an den Segmenten von *Cyclamen persicum* die Sproßbildung erhöht. Die Erhöhung ist jedoch nicht wie beim Tabak proportional der zugegebenen Adeninmenge, denn auf den raschen Anstieg bei 10 mg/l bzw. 20 mg/l folgt bei 30 und 40 mg/l Adenin ein leichtes Absinken der Werte. Erst bei einer weiteren Steigerung der Adeningaben erfolgt wieder ein erneuter Anstieg bis zu dem maximalen Wert von 6,5 Sprossen p. Segm. bei Addition von 120 mg/l Adenin (Abb. 21). Ebenso wie bei der NAA werden also von *Cyclamen persicum* auch wesentlich höhere Gaben Adenin vertragen als vom Tabak. Die für Tabak toxische Gabe von 50 mg/l Adenin liegt für *Cyclamen* noch weit unterhalb des Optimums von 120 mg/l. Erst bei der 4fachen Menge — nämlich 200 mg/l Adenin — ist der toxische Grenzwert auch für *Cyclamen* erreicht.

Tabelle 9. *Wirkung von Adeninsulfat auf Knollensegmente von Cyclamen persicum.* $T = 25^0$ C, NL = St. I, $p_H = 4$

Kontrolle	10	20	30	40	50	120	Adeningehalt mg/l
37	36	29	34	38	35	24	Zahl der Kulturen
51	127	114	105	134	151	157	Zahl der Sprosse
1,4	3,7	4,1	3,4	3,5	4,3	6,5	Sprosse/Segment
—	1	2	1	1	—	5	Zahl der Wurzeln
—	1	2	1	1	—	4	Wurzeln + Sprosse
17.5.	29.4.	29.4.	20.4.	29.4.	10.5.	12.5.	
bis	bis	bis	bis	bis	bis	bis	Versuchsdauer
25.7.	25.7.	25.7.	25.7.	25.7.	25.7.	25.7.	

Vergleicht man die sproßbildende Wirkung von Adenin mit der der NAA, so zeigt sich, daß die Zugabe von 120 mg/l Adenin mit 6,5 Sprossen p. Segm. etwa die gleiche Wirkung hat wie die Zugabe von 0,005 mg/l NAA mit 5,0 Sprossen p. Segm.

Wenn wir von den wenigen in den Adeninversuchen gebildeten Wurzeln absehen (in 263 Kulturen 10 Wurzeln), die zudem in ihrem Aussehen ziemlich von den bei geeigneten NAA-Gaben reichlich entstehenden Wurzeln abwichen, so läßt sich weiterhin sagen, daß das Adenin die Wurzelbildung, sowie auf jeden Fall die Kallusbildung unterdrückt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde — nur als Stichprobe — das Verhalten der Segmente bei kombinierten Gaben von 0,1 mg/l NAA und 40 mg/l Adenin geprüft. 26 Kulturen wurden angesetzt, von denen, nachdem alle eine Korkschicht gebildet hatten, jedoch nur 7 in irgendeiner Form reagierten. Die restlichen waren zwar noch lebend (unter der Korkschicht befanden sich weiße, parenchymatische Zellen, KUZICKERs Probe fiel positiv aus), doch zeigte sie keinerlei Wachstum oder Organbildung. Zwei Kulturen bildeten nun in dem genannten Versuch in der üblichen Weise je 2 Wurzeln aus, an 5 Kulturen entstanden 15 Sprosse. Hier wirkten also NAA und Adenin in der gegebenen Konzentration dergestalt zusammen, daß die sproßbildende Wirkung der einen Substanz von der wurzelbildenden der anderen gerade gehemmt wurde und umgekehrt. Wie die 7 organbildenden Kulturen zeigen, ist dieses Gleichgewicht aber doch so labil, daß es mitunter nach der einen oder anderen Seite umschlagen kann (Tabelle 10).

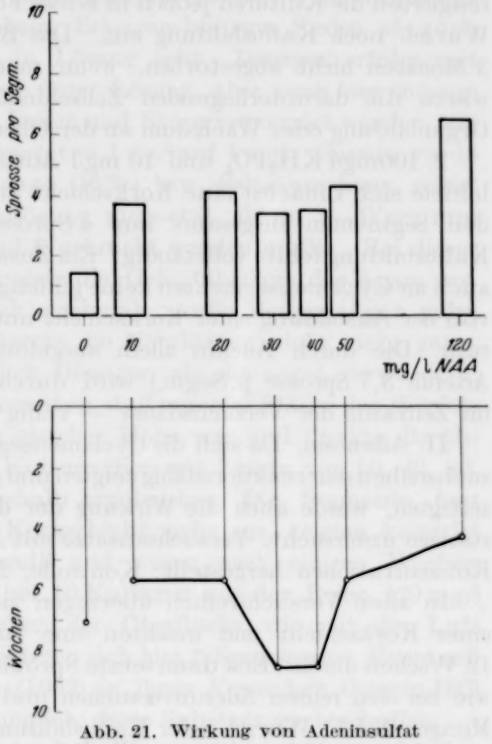


Abb. 21. Wirkung von Adeninsulfat auf Knollensegmente von *Cyclamen persicum*

Tabelle 10. *Wirkung von NAA + Adeninsulfat auf Knollensegmente von Cyclamen persicum.* $T = 25^0$ C, NL = St. I, $p_H = 5$, Versuchsdauer 75 Tage

0,1	NAA-Gehalt mg/l
4,0	Adeningehalt mg/l
26	Zahl der Kulturen
15	Zahl der Sprosse
0,6	Sprosse pro Segment
4	Wurzeln
1	Sprosse + Wurzeln

Außer den reinen Adeninreihen wurden sodann noch weitere Versuche angesetzt, bei denen Adenin mit anderen Stoffen kombiniert wurde. Zunächst wurden 2 Versuchsreihen durchgeführt, die neben Adenin noch einen Zusatz von 50/100 mg/l KH_2PO_4 enthielten. Hier sollte festgestellt werden, wie das Phosphat, das auf die Pelargonien einen so nachteiligen Einfluß hatte, an Cyclamensegmenten in Kombination mit Adenin wirkt.

1. 50 mg/l KH_2PO_4 und 10 mg/l Adenin (18 Kulturen). An den Segmenten setzte Korkbildung in der üblichen Weise ein, davon abgesehen reagierten die Kulturen jedoch in *keiner* Form, es trat weder Sproß- noch Wurzel- noch Kallusbildung ein. Die Stücke waren zwar noch nach 3 Monaten nicht abgestorben, wenn man die Korkschicht entfernte, waren die darunterliegenden Zellschichten weiß (KUZICKER positiv). Organbildung oder Wachstum an der Oberfläche erfolgten jedoch nicht.

2. 100mg/l KH_2PO_4 und 10 mg/l Adenin (36 Kulturen.) Auch hier bildete sich zunächst eine Korkschicht aus, nach 12 Wochen waren an den Segmenten insgesamt nur 4 Sprosse entstanden, Wurzel- und Kallusbildung fehlte vollständig. Ein Zusatz von Phosphat hat demnach auch an Cyclamensegmenten keine günstigen Auswirkungen. Abgesehen von der Ausbildung einer Korkschicht unterbleibt jedes weitere Wachstum. Die durch Adenin allein ausgelöste Organbildung (bei 10 mg/l Adenin 3,7 Sprosse p. Segm.) wird durch das Phosphat — zumindest im Zeitraum der Versuchsdauer — völlig unterdrückt.

II. Adenosin. Da sich die Cyclamensegmente in allen bisherigen Versuchsreihen sehr reaktionsfähig zeigten und gut reproduzierbare Ergebnisse zeitigten, wurde auch die Wirkung der dem Adenin verwandten Substanzen untersucht. Versuchsansätze mit Adenosin wurden in folgenden Konzentrationen hergestellt: Kontrolle, Adenosin 10, 40, 80, 120 mg/l.

In allen Versuchsreihen überzogen sich die Segmente wieder mit einer Korkschicht und machten eine lange Ruheperiode von 10 bis 12 Wochen durch. Erst dann setzte Sproßbildung ein, die ebenso erfolgte wie bei den reinen Adeninversuchen und den Versuchen mit geringen Mengen NAA. Wurzel- oder Kallusbildung erfolgte in *keinem* Falle.

Das Überraschende an den Versuchsergebnissen war, daß die Sproßbildung in einem äußerst geringen, nicht einmal den Durchschnittswert der Kontrollen erreichenden, Umfang eintrat und daß die Zahl der neugebildeten Sprosse mit 0,6 p. Segm. für *alle* verwendeten Konzentrationen Adenosin eine geradezu verblüffende Konstanz zeigte.

1. Kontrolle		(25 Kulturen)	15 Sprosse 0,6 p. Segm.
2. Adenosin	10 mg/l	(27 Kulturen)	15 Sprosse 0,55 p. Segm.
3. Adenosin	40 mg/l	(25 Kulturen)	15 Sprosse 0,6 p. Segm.
4. Adenosin	80 mg/l	(15 Kulturen)	8 Sprosse 0,5 p. Segm.
5. Adenosin	120 mg/l	(25 Kulturen)	15 Sprosse 0,6 p. Segm.

Adenin und Adenosin, die sich hinsichtlich ihres Effektes an Tabakstengelsegmenten nicht unterscheiden, haben demnach an Knollensegmenten von *Cyclamen persicum* völlig andere Wirkungen. Während Adenin die Anzahl der Sprosse p. Segm. wesentlich erhöht, die Wurzel- und Kallusbildung aber weitgehend unterdrückt, hemmt Adenosin zwar auch die Wurzel- und Kallusbildung vollständig, es hat aber keinen fördernden Einfluß auf die Sproßbildung; Kulturen mit Zusatz von Adenosin unterscheiden sich praktisch nicht von den Kontrollversuchen.

III. Guanin. Den Versuchen mit Guanin, über die sich bei F. Skoog u. C. Miller (1953) nur eine kurze Notiz findet, stellte sich eine wesentliche Schwierigkeit entgegen. Diese bestand in der Wasserunlöslichkeit des Guanins, das sowohl beim Erhitzen bis zum Sieden als auch unter Druck nur spurenweise in Lösung geht. Dagegen erfolgt mit Laugen oder Säuren Salzbildung unter Lösung, aber auch hier müssen verhältnismäßig große Mengen Lauge und Säure verwendet werden, um eine völlige Auflösung zu erzielen (etwa 1 cm^3 auf 1 mg). Guanin wurde also versuchsweise in Natronlauge (16%) bzw. Salzsäure konz. gelöst und in dieser Form der Nährlösung zugesetzt, deren p_H-Wert nun wieder mit NaOH bzw. HCl auf 6 gebracht werden mußte. Bei dieser Behandlung wurde jedoch offenbar die Gelierfähigkeit des Agars zerstört, und obwohl nachträglich nochmals große Mengen Agar pulv. (Merck) zugefügt wurden, erstarrte die Nährlösung nicht mehr ganz. Sie blieb immer noch wesentlich flüssiger, als die sonst verwendete, so daß die Segmente so weit einsanken, daß nur *eine* Fläche des Würfels mit dem Flüssigkeitsspiegel in gleicher Höhe war und direkte Berührung mit der Luft hatte. Die Kulturreihen mit Zusatz von 10, 40, 80, 120 mg/l Guanin verliefen deshalb ergebnislos. Die Segmente, fast untergetaucht, bildeten keine Korkschicht mehr aus, zeigten keinerlei Wachstum, färbten sich fahlweiß und waren nach einigen Wochen völlig abgestorben. Lediglich bei 10 Kulturen aus der Reihe 120 mg/l Guanin trockneten einige Stellen der Oberfläche, die mit der Luft Berührung hatten, ab und es bildeten sich hier 5 Sprosse aus. Eventuell haben F. Skoog u. C. Miller (1953) in ihren Versuchen Guanin-HCl benutzt, es war jedoch nicht möglich, diese Substanz zu beschaffen.

In weiteren Versuchen wurde deshalb gar nicht erst versucht, das Guanin in Lösung zu bringen, sondern Guanin in unlöslicher Form zugegeben. Eine geringe Menge des Stoffes blieb dann beim Erstarren des Agars in Form einer Suspension in der Nährlösung verteilt, der Hauptteil des Guanins lag jedoch — erkennbar als weißer, flockiger Niederschlag — am Boden des Reagensglases.

Gleichzeitig wurde die Versuchsanordnung dahingehend erweitert, daß neben Guanin noch Ammoniumnitrat zugegeben wurde. Wie schon erwähnt, schreiben F. Skoog u. C. Miller (1953) dem Ammoniumnitrat, wenn es im Zusammenhang mit Adenin gegeben wird, eine günstige Wirkung auf die Sproßbildung zu. Die Kulturansätze, die eine Kombination von Guanin 80 mg/l und Ammoniumnitrat 100 mg/l enthielten, hatten folgende Ergebnisse (19 Kulturen): Zunächst bildeten die Kulturen in der üblichen Weise eine Korkschicht aus, aber schon nach 35 Tagen setzte Sproßbildung ein, die überraschend hohe Resultate brachte: 5,9 Sprosse p. Segm. wurden produziert. Diese Sprosse entstanden jedoch nicht in der bisher beschriebenen Weise aus Rissen

in der Korkschicht, sondern das Segment begann sich stellenweise — fast wie bei der Ausbildung von Wurzeln — in immer stärker werdendem Maße emporzuwölben, schließlich rissen die oberen Zellschichten auf und die jungen Sprosse brachen durch. Während die in den Adeninreihen entstandenen Sprosse stets einzeln und voneinander isoliert aufgetreten waren, bildeten sich in den Guaninversuchen jeweils eine ganze Gruppe mit mehreren, dicht gedrängt liegenden Sprossen aus.

Da die Ergebnisse der letzten Versuche so günstig gewesen waren, wurde nun die Versuchsanordnung nochmals modifiziert und in einem neuen Versuchsansatz die Menge des in der Nährlösung an sich schon vorhandenen Arginins erheblich erhöht und ebenfalls mit Guanin und Ammoniumnitrat kombiniert.

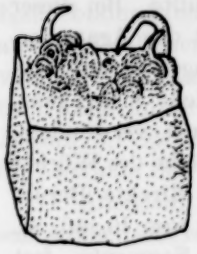


Abb. 22. Ammoniumnitrat 100 + Arginin-HCl 100 + Guanin 80 mg/l

Die Rolle des Arginins (F. SKOOG u. C. MILLER 1953) das an Tabakstengelsegmenten einen allgemein wachstumsstimulierenden Effekt zeigt, ist allerdings wohl noch weitgehend ungeklärt. An Stelle von Glycocoll oder Cystein-HCl in Konzentration von 2—3 mg/l der Nährlösung zugesetzt, hatte es keine auffallende Wirkung.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt: Ammoniumnitrat 100 mg/l, Arginin-HCl 100 mg/l, Guanin (ungelöst) 80 mg/l (19 Kulturen).

Auch hier setzte die Sproßbildung, nachdem in den ersten Wochen eine Korkschicht die Segmente überzogen hatte, schon nach 30 Tagen ein, nach 60 Tagen erreichte sie ein Maximum von 169 = 8,9 Sprossen p. Segm. Die jungen Sprosse entstanden — wie in der vorhergehenden Versuchsreihe — gehäuft aus Wölbungen der Oberfläche in Form kräftiger Vegetationspunkte. Wurzel- oder Kallusbildung war nicht zu beobachten.

Von allen bisher angesetzten Versuchsreihen ist die Zahl der gebildeten Sprosse in diesem Ansatz am höchsten. Im Vergleich zum Kontrollversuch wird durch Zugabe der obengenannten Substanzen die Sproßbildung um das 9fache gesteigert. Diese Tatsache ist um so überraschender, wenn man bedenkt, daß das Guanin ja nicht einmal gelöst war und infolgedessen wohl nur ein geringer Prozentsatz der Substanz wirksam ist. Offensichtlich reicht das Guanin in der verabfolgten Form und Menge völlig aus, um die Segmente zur Bildung von Sprossen anzuregen (Abb. 22).

Daß bei den letzten Versuchen dem Ammoniumnitrat allein keine sproßbildende Wirkung zugeschrieben werden kann, bewies sich in weiteren Kulturen, die nur einen Zusatz von 100 mg/l Ammoniumnitrat enthielten. (18 Kulturen.) Zunächst bildet sich eine dichte Korkschicht aus, nach 40 Tagen werden Sprosse in der bei den Adeninreihen beschriebenen Art gebildet, deren Zahl mit 30 = 1,7 p. Segm. die Durchschnitts-

zahl der Kontrolle nur unwesentlich übersteigt. Es traten keine Wurzeln auf, die Kallusbildung unterblieb.

Wenn wir abschließend Adenin, Adenosin und Guanin in Hinblick auf ihre sproßfördernde Wirkung vergleichen wollen, so wird dies natürlich dadurch erschwert, daß Guanin in gelöster Form nicht der Nährlösung zugesetzt werden konnte, quantitative Aussagen also nicht möglich sind. Feststeht, daß Adenin einen großen Einfluß auf die Sproßbildung hat (Kontrolle: 1 Sproß p.Segm. — Adenin 120 mg/l: 6,5 Sprosse p. Segm.), während Adenosin an Cyclamensegmenten die Sproßbildung nicht fördert. Guanin in Kombination mit Ammoniumnitrat und Arginin führte zur Ausbildung von 9 Sprossen p. Segm. und hat somit einen außerordentlich starken Einfluß auf die Sproßbildung an Cyclamensegmenten.

Alle drei Substanzen aber, sowohl Adenin wie Adenosin als auch Guanin, haben keine Wirkung auf die Wurzel- und Kallusbildung, die, ebenso wie in den Kontrollen, völlig unterbleibt.

C. Kokosnußmilch und Nicotinsäure

1. Kokosnußmilch

Daß Zusätze von Kokosnußmilch das Wachstum von Tabakstengelsegmenten und anderen Gewebekulturen fördern, ist in der letzten Zeit oft beschrieben und ausführlich untersucht worden (S. Wiggans). An Pelargonienstengelsegmenten konnte allerdings nicht festgestellt werden, daß Kokosnußmilch das Wachstum der Segmente irgendwie beeinflußt. Da die Cyclamensegmente aber ganz anders reagierten als die Pelargoniensegmente, wurde auch bei diesen die Wirkung der Kokosnußmilch auf das Wachstum und die Organbildung untersucht.

11 Kulturen, St. I + 10 cm^3/l Kokosnußmilch. Nach der Ausbildung einer Korkschicht setzten Wachstum und Sproßbildung verhältnismäßig spät, nach 55 Tagen, ein, insgesamt entstanden 18 Sprosse = 1,7 p. Segm., also kaum mehr als in den Kontrollen. Weder Kallus- noch Wurzelbildung trat auf, 5 Kulturen zeigten sogar keinerlei Wachstum. Es kann demnach nicht festgestellt werden, daß der Zusatz von Kokosnußmilch einen wachstumsstimulierenden Effekt oder organbildende Wirkung auf Segmente von *Cyclamen persicum* ausübt.

2. Nicotinsäure

Nicotinsäure (F. Skoog u. C. Miller 1953) spielt als sproßanregende Substanz eine ungeklärte Rolle. Wenigstens eine Versuchsreihe wurde zur Aufklärung eines möglichen Einflusses auf *Cyclamen* angesetzt.

25 Kulturen, St. I + 50 mg/l Nicotinsäure. Nachdem sich auch hier eine dichte Korkschicht gebildet hatte, entwickelten sich nach 8 Wochen 65 Sprosse = 2,6 p. Segm. Kallus- und Wurzelbildung unterblieben vollständig.

Ein Zusatz von 50 mg/l Nicotinsäure hat demnach, sowohl was die Zahl der angelegten Organe als auch die Zeitspanne ihres Erscheinens betrifft, genau dieselbe Wirkung wie ein Zusatz von 40 mg/l Adenin. Da weitere Versuche mit abgestuften Nicotinsäuregaben aber nicht gemacht wurden, läßt sich ein genauer Vergleich ihrer Wirkungsweise mit der des Adenins nicht ziehen. In der gegebenen Konzentration hat Nicotinsäure jedenfalls einen deutlichen, wenn auch mäßigen Einfluß auf die Sproßbildung.

Eine Zusammenfassung der letzten 5 Versuchsreihen gibt Tabelle 11, eine Übersicht des zeitlichen Erscheinens der Sprosse Abb. 23.

Alle Kulturen, an denen während der bis zu 100tägigen Versuchsdauer in vitro Organbildung beobachtet werden konnte, wurden nach Ablauf dieser Zeit mit einer Pinzette aus den Gläsern herausgenommen und in Holzkästen in eine für *Cyclamen* geeignete Erdmischung ausgepflanzt.

Zunächst zeigten sich auch an den Stücken mit bereits ausgebildeten Sprossen, die ja allein der direkten Beobachtung zugänglich waren, keine sichtbaren Veränderungen. Auch die Segmente ohne Sprosse, mit oder ohne Wurzeln, verharrten auf dem erreichten Entwicklungszustand. Da alle Stücke mit einer mehr oder weniger starken Korkschicht umgeben waren, bestand nach Übertragung in Erde keine wesentliche Infektionsgefahr. Erst nach 5—6 Wochen setzte ein kräftiges Wachstum ein, wobei folgendes zu beobachten war:

An denjenigen Sprossen, die schon in vitro etwa 1 cm große Blättchen entwickelt hatten, wuchsen diese zu normalen, großen Blättern aus, die von den an ganzen Cyclamenknollen unter normalen Bedingungen gebildeten nicht zu unterscheiden waren. Am schnellsten wuchsen die Blätter erwartungsgemäß an den Segmenten, die schon in vitro neben den Sprossen Wurzeln ausgebildet hatten. An jenen Segmenten aber,

Tabelle 11. *Wirkung verschiedener Zusatzstoffe auf Knollensegmente von Cyclamen persicum.* $T = 25^0$ C, NL = St. I, $p_H = 4$

Kontrolle	Kokosmilch 10 cm/l	Nicotinsäure 50 mg/l	Ammoniumnitrat 100mg/l	Ammoniumnitrat 100 mg/l + Guanin 80 mg/l	Ammoniumnitrat 100 mg/l + Guanin 80 mg/l + Arginin-HCl 100 mg/l	Art der Zusatzstoffe zur Nährlösung St. I
37	11	25	18	19	19	Zahl der Kulturen
51	18	65	30	112	169	Zahl der Sprosse
1,4	1,7	2,6	1,7	5,9	8,9	Sprosse/Segment
—	—	—	—	—	—	Wurzeln
—	—	—	—	—	—	Sprosse + Wurzeln
17.5. bis 25.7.	17.5. bis 25.7.	17.5. bis 25.7.	17.5. bis 25.7.	17.5. bis 25.7.	17.5. bis 25.7.	Versuchsdauer

an denen die Sprosse noch in Form ganz junger Vegetationskegel vorhanden waren, setzte das Wachstum der Blätter sehr rasch und normal ein, sobald sie nach dem Auspflanzen Wurzeln gebildet hatten. Hatten sie aber nach 5—6 Wochen noch keine Wurzeln entwickelt, so blieben die Sprosse auch weiterhin auf dem erreichten Entwicklungszustand stehen, waren jedoch auch nach 3 Monaten noch nicht abgestorben. Es scheint aber offenbar nur eine Frage der Zeit zu sein, daß sich auch an diesen sproßtragenden Segmenten schließlich Wurzeln ausbilden.

Segmente, die zum Zeitpunkt des Auspflanzens nur Wurzeln gebildet hatten, zeigten bei wiederholten Stichproben, daß sich die Wurzeln normal und kräftig weiterentwickelten. Sprosse bildeten sich an Segmenten, die in vitro nur Wurzeln produzierten, im Verlauf von 3 Monaten nicht, ob es zu einem späteren Zeitpunkt doch noch zu einer Sproßbildung kommen wird, kann nicht gesagt werden. Als wesentliches Ergebnis bleibt jedenfalls festzustellen, daß auch Segmente, die zur Zeit des Auspflanzens nur Sprosse trugen, im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung Wurzeln hervorbringen konnten[1].

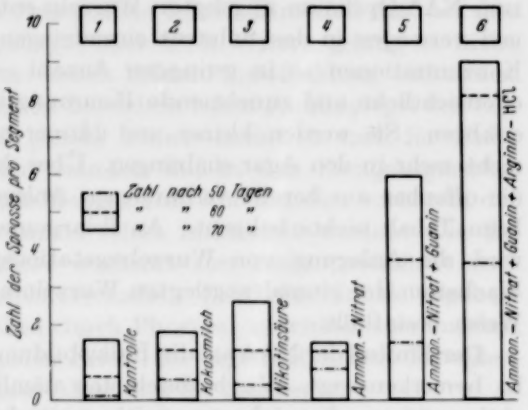


Abb. 23. Wirkung verschiedener Zusatzstoffe auf die Sproßbildung an Knollensegmenten von *Cyclamen persicum*

Diskussion

Die im experimentellen Teil im einzelnen beschriebenen Versuchsergebnisse sind für die beiden Objekte *Pelargonium* und *Cyclamen* so verschieden, daß eine getrennte Besprechung zweckmäßig erscheint.

1. Pelargonium zonale

Ebenso wie bei allen bisher untersuchten Objekten sind auch bei *Pelargonium* die Wuchsstoffe — im vorliegenden Falle NAA — von entscheidender Bedeutung für die Anlegung von Wurzeln und das Wachstum von Kallus.

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Soweit die in Kistchen pikierten Segmente kräftiges Wachstum zeigten, wurden sie später in Töpfe verpflanzt. Dort haben sie sich inzwischen außerordentlich kräftig zu völlig normalen Pflanzen entwickelt, eine neue Knolle regeneriert und zeigen zum Teil einen äußerst reichen Knospenansatz (Haustein).

Vergleichen wir speziell die Verhältnisse bei *Pelargonium* mit den Ergebnissen eingehendster Untersuchungen an Tabak, so zeigt sich zunächst hinsichtlich der Wurzelbildung ein weitgehend übereinstimmendes Verhalten. Auch die optimalen Konzentrationen unterscheiden sich kaum voneinander: Tabak 0,08 mg/l, *Pelargonium* 0,1 mg/l NAA. Übereinstimmung besteht auch in der verschiedenartigen Ausbildung der Wurzeln in Abhängigkeit von der NAA-Konzentration. Die bis zum NAA-Optimum angelegten Wurzeln entwickeln sich kräftig weiter und vermögen in das Substrat einzudringen, während die bei höheren Konzentrationen — in geringerer Anzahl — gebildeten Wurzeln eine offensichtliche und zunehmende Hemmung in ihrer Weiterentwicklung erfahren. Sie werden kleiner und dünner und können schließlich gar nicht mehr in den Agar eindringen. Über das Auftreten von Wurzeln, die offenbar aus bereits vorhandenen Anlagen stammen, ist allerdings beim Tabak nichts bekannt. An Pelargonien wie an Tabaksegmenten wird die Anlegung von Wurzelvegetationspunkten und das weitere Wachstum der einmal angelegten Wurzeln also durch NAA in gleicher Weise beeinflußt.

Der Einfluß der NAA auf die Kallusbildung bei Pelargoniensegmenten ist bemerkenswert. Wir beobachteten nämlich 2 unterschiedliche Reaktionsweisen, die sich gegenseitig weitgehend ausschließen. Welche der beiden Reaktionen eintritt, sowie deren jeweiliges Ausmaß wird ausschließlich bestimmt durch die NAA-Konzentration. Wie im experimentellen Teil eingehend beschrieben, bildet sich bei niedrigen Konzentrationen bis zu 0,1 mg/l in zunehmender Stärke ein sehr regelmäßiger und geordneter Kallus an der morphologisch unteren Querschnittsfläche mit Ausgangspunkt vom Cambium. Bei höheren Gaben von NAA wird diese Art der Kallusbildung abgelöst von einem aus subepidermalen Rindenzellen hervorgehenden Kallus, der schließlich einen ausgesprochen hypertrophen Charakter annimmt, denn zuletzt werden nur noch locker zusammenhängende Zellhaufen gebildet. Wieweit diese unterschiedlichen Kallusbildungen auch beim Tabak auftreten, wurde nicht geprüft, beschrieben sind sie jedenfalls noch nicht.

Ein wesentlicher Unterschied der Pelargonien gegenüber dem Tabak besteht dagegen hinsichtlich der Induktion von Sproßvegetationspunkten. Während es sich beim Tabak darum handelte, eine wenn auch nur in geringerer Häufigkeit auch an den Kontrollen schon auftretende Sproßbildung zahlenmäßig zu steigern bzw. die Bedingungen zu finden, welche die von vornherein schon gegebenen Möglichkeiten zur Sproß- oder Wurzelbildung in die eine oder andere Richtung lenken, galt es für *Pelargonium* überhaupt erst, eine Sproßbildung zu induzieren. Adenin und diesem verwandte Verbindungen, die beim Tabak einen sproßfördernden Einfluß besitzen, waren bei Pelargonien ohne jede

Wirkung; d.h. sie waren unwirksam in bezug auf die Sproßbildung; denn es besteht volle Übereinstimmung zwischen den Befunden an Pelargonien und Tabak darin, daß durch Adenin die Kallus- und Wurzelbildung vollständig unterdrückt wird. Gerade diese Teilwirkung des Adenins ist vielleicht nicht ohne Interesse für die Beantwortung der Frage nach der Möglichkeit einer Sproßinduktion bei *Pelargonium*.

Zuvor seien jedoch erst noch die weiteren Versuchsergebnisse besprochen. An sich stellt ja *Pelargonium* keinen Einzelfall dar, bei dem eine Sproßbildung nicht gelingt; auch P. R. White gelang es nicht, an Karottenstengelsegmenten durch Adenin Sproßbildung auszulösen. P. R. White macht dafür einen besonders hohen Auxinspiegel der Segmente verantwortlich. Das gleiche könnte natürlich auch für *Pelargonium* angenommen werden, nämlich daß in den Stengelsegmenten von vornherein derartig große Mengen von Wuchsstoffen vorliegen, daß alle sproßanregenden Substanzen sofort inaktiviert werden. Die Berechtigung zu dieser Annahme erscheint aber recht zweifelhaft nach den Ergebnissen der Phosphatversuche. Die beim Tabak gegebene Möglichkeit, hohe Auxingaben durch Phosphat unwirksam zu machen, war bei *Pelargonium* ohne jeden Erfolg; im Gegenteil, höhere Phosphatgaben führten kurzfristig zum Absterben der Segmente.

Was sich aus den Versuchen schließen läßt, scheint wohl das zu sein, daß Adenin nur dann einen Einfluß auf die Sproßinduktion hat, wenn die betreffende Pflanze bereits „latent" dazu befähigt ist. Diese Bedeutung eines verschiedenen Reaktionsvermögens der Pflanzen wird bekräftigt gerade durch die positiven Ergebnisse unseres zweiten Versuchsobjektes, *Cyclamen persicum*.

2. *Cyclamen persicum*

Die Knollensegmente von *Cyclamen persicum* haben sich als außerordentlich günstiges Objekt zum Studium der Sproß- und Wurzeldifferenzierung erwiesen. Gegenüber den bisher zu Gewebekulturen vorzugsweise verwendeten Stengelstücken von *Helianthus*, *Nicotinia* und *Daucus* weist *Cyclamen* zudem merkliche Vorteile auf, zunächst einmal in rein technischer Hinsicht. Die im methodischen Teil beschriebene Sterilisation ist nicht nur äußerst einfach, sondern bei einem Ausfall von nur 10—15% auch sehr zuverlässig. Ein weiterer Vorteil, der gerade in der Verwendung des Knollengewebes liegt, besteht darin, daß in einem einzigen Arbeitsgang durch einfaches Zerschneiden 70 bis 100 Gewebestücke sterilisiert und sofort in die Kulturgefäße eingelegt werden können, während bei allen Stengelteilen jedes einzelne Segment eine besondere Behandlung erfordert. Was speziell die Verwendung von Knollengewebe betrifft, so bietet dieses ebenfalls merkliche Vorteile. Einmal sind die als Ausgangsmaterial verwendeten Gewebestücke ein-

heitlich aus parenchymatischem Gewebe aufgebaut, es entfällt also jegliche Differenzierung in verschiedene Gewebearten. Wie die Versuchsergebnisse zeigten, war auch keinerlei polare Differenzierung hinsichtlich der Sproß- und Wurzelbildung ausgeprägt. Zu dieser Einheitlichkeit im Aufbau aus unspezialisierten Parenchymzellen kommt dann weiter hinzu, daß durch die große Zahl der aus einer Knolle erzielbaren Kulturansätze auch eine völlige Einheitlichkeit derselben gegeben ist. Auf diese beiden letzten Tatsachen ist es wohl auch weitgehend zurückzuführen, daß die Reaktion innerhalb eines Kulturansatzes fast immer 100%ig erfolgte. Bei *Pelargonium* zeigte immer nur ein gewisser Teil der Versuchsreihe Reaktionen. Weiterhin ist festzustellen, daß die Cyclamengewebestücke schon auf geringe Variation der Zusatzstoffe im Nährmedium mit eindeutig faßbaren Unterschieden reagierten und — wie speziell in einem bestimmten Fall gezeigt — diese Ergebnisse äußerst genau reproduzierbar sind.

Ein in seiner Bedeutung nicht zu unterschätzender prinzipieller Unterschied zwischen den Cyclamensegmenten und den zur Gewebekultur verwendeten Stengelstücken besteht ferner darin, daß in letzteren immer schon von vornherein ein cambiales Gewebe vorhanden ist, bzw. daß überhaupt nur das cambiale Gewebe (z. B. in den letzten Tabakversuchen von F. Skoog) verwendet wird, während bei *Cyclamen* nur unspezialisiertes Gewebe in Kultur genommen wird.

Was nun die Versuchsergebnisse betrifft, so haben diese in eindeutiger Weise gezeigt, daß es bei *Cyclamen* möglich ist, die Organneubildung in jede gewünschte Richtung willkürlich zu steuern. Am eindrucksvollsten sind dabei die Ergebnisse mit NAA: Allein die Konzentration der NAA entscheidet, ob Sprosse, Wurzeln oder ungeordneter Kallus gebildet werden. Niedrige Konzentrationen von 0,005 bis 0,4 mg/l führen zur Sproßbildung, Konzentrationen von 0,4—3,0 mg/l rufen Wurzelbildung hervor, während noch höhere Konzentrationen von 3,0—10,0 mg/l das Kalluswachstum induzieren. Vergleicht man für die 3 verschiedenen Reaktionen die Zeiten, die bis zum Sichtbarwerden des Effektes notwendig sind, so sehen wir, daß diese auffallend verschieden sind. Kallus zeigt sich bereits nach 1—2 Wochen, Sprosse und Wurzeln werden erst nach etwa 7 Wochen erkennbar.

Da die Sproßbildung in den Kontrollen nur äußerst gering ist (0,004 p. Segm.), durch niedrige Konzentrationen NAA aber außerordentlich gefördert wird, kann keine Rede davon sein, daß etwa der Wuchsstoff die Sproßbildung zugunsten der Anlegung von Wurzeln oder Kallusgewebe unterdrückt, bzw. daß es ein Wuchsstoffmangel ist, der bei *Cyclamen* zur Sproßbildung führt. Sonst könnte die Abhängigkeit der Sproßbildung von der Wuchsstoffkonzentration nicht die Form einer Optimumkurve zeigen, sondern müßte von 0 an mehr oder weniger

gleichmäßig abfallen. Besonders charakteristisch ist in dieser Hinsicht der „Umschlagspunkt" der NAA-Konzentration bei 0,4 mg/l: In diesem Bereich wird die Organbildung fast gänzlich unterdrückt. Deutlich zeigt sich auch hier ihr labiler Charakter, da sowohl Sprosse als auch Wurzeln entstehen können.

Der Gedanke, daß wir es bei der Sproßbildung einerseits und bei der Wurzelbildung andererseits mit 2 verschiedenen Systemen zu tun haben, von denen das eine nur auf niedrige NAA-Konzentrationen anspricht, während das andere erst bei höheren Konzentrationen in Aktion tritt, wird bekräftigt durch die Befunde der Adeninversuche. Der gleiche Effekt wie durch geringe Gaben NAA kann nämlich auch erzielt werden durch geeignete Zusätze von Adenin. Eine Induktion von Wurzeln ist dagegen durch keine Konzentration von Adenin möglich. Welche Beziehungen zwischen Adenin und NAA bestehen, bzw. welche Reaktionen aus einer gleichzeitigen Einwirkung abgestufter Mengen Adenin und NAA resultieren, ist in weiteren Versuchen zu klären. Das in seiner sproßbildenden Wirkung dem Adenin oft gleichgesetzte Adenosin erwies sich bei *Cyclamen* als unwirksam. Ganz auffallend war dagegen der Einfluß eines kombinierten Zusatzes von Guanin und Ammoniumnitrat in Verbindung mit einer stark erhöhten Arginindosis. Von allen Versuchsreihen führte diese zum besten Ergebnis, indem je Segment 9 Sprosse induziert wurden. Allerdings ist eine quantitative Beurteilung der Versuche infolge der fast völligen Wasserunlöslichkeit des Guanins nicht möglich.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß auch bei *Cyclamen persicum* ein Zusatz der 4—8fachen Phosphatmenge keinen Einfluß auf die Sproßbildung ausübt. Die von F. Skoog an Tabaksegmenten nachgewiesene sproßbildende Wirkung der Phosphatkomponente kann demnach nicht verallgemeinert werden, denn an den beiden von uns untersuchten Objekten hatte Phosphat entweder einen toxischen oder überhaupt keinen Einfluß.

Alle an *Cyclamen* gewonnenen Versuchsergebnisse legen den Schluß nahe, daß — jedenfalls bei *Cyclamen* — Sproß- bzw. Wurzelbildung an zwei bis zu einem gewissen Grade unabhängige Systeme gebunden ist. Während das wurzelbildende System aber ausschließlich durch hohe NAA-Gaben in Aktion gesetzt wird, ist das sproßbildende System durch eine ganze Reihe verschiedener Stoffe in Gang zu bringen: Niedrige Konzentrationen von NAA, hohe Gaben von Adenin, Guanin usw.

Vergleichen wir diese Verhältnisse mit *Pelargonium*, wo zwar die Wurzelanlegung in völlig entsprechender Weise wie bei *Cyclamen* gesteuert werden konnte, aber eine Sproßbildung durch keinen der bei *Cyclamen* so erfolgreichen — unter sich allerdings sehr verschiedenen — Zusätze induzierbar war, so bestätigt das einmal die Annahme, daß

Sproß- und Wurzelbildung zwei voneinander getrennte Vorgänge sind. Weiterhin zeigt sich, daß Adenin, Wuchsstoff in niedriger Konzentration usw. keine sproßinduzierende Wirkung schlechthin haben, sondern daß die genannten Substanzen nur dann eine Sproßbildung auslösen können, wenn in dem jeweiligen Objekt von vornherein schon eine Ansprechbarkeit gegeben ist. Wodurch dieser ansprechbare Zustand etwa bei *Pelargonium* hervorgerufen werden könnte, ist gänzlich unbekannt und es lassen sich auch keinerlei Vermutungen darüber anstellen.

Im Vergleich zu Tabak und *Pelargonium* unterscheidet sich *Cyclamen* weiterhin noch ganz auffallend dadurch, daß die verträglichen Gaben — bzw. die zu einem optimalen Effekt notwendigen Gaben — von NAA und Adenin wesentlich höher liegen. Während die optimale Dosis zur Anregung von Wurzeln bei Pelargonien 0,1 mg/l (Tabak 0,08 mg/l) beträgt, benötigt man bei *Cyclamen* die 30fache Menge, um eine maximale Wurzelanlegung hervorzurufen. Ähnlich — wenn auch nicht so ganz ausgeprägt — liegen die Verhältnisse bei Adenin; bei Tabak wirken sich bereits 50 mg/l, bei *Cyclamen* erst die 4fache Menge dieser Substanz toxisch aus. Die Ursache hierfür liegt jedoch sicher nicht in der Tatsache, daß die Stoffaufnahme nach 3—4 Wochen durch die Ausbildung einer Korkschicht an der dem Substrat aufliegenden Seite des Segmentes erschwert bzw. ganz unterbunden wird. Daß die hohen Gaben von NAA auch dauernd vertragen werden, zeigen deutlich die in das Substrat eindringenden Wurzeln, die ohne die geringste Schädigung oder Hemmung ein außerordentlich kräftiges, dauerndes Wachstum zeigen.

Im Gegensatz zu einer Laufzeit der Kulturen von 30—40 Tagen, wie sie von P. R. WHITE und F. SKOOG angegeben wird, betrug diese bei *Cyclamen* sogar durchschnittlich 90—100 Tage.

Unabhängig von der Frage der Stoffaufnahme ist die Ausbildung eines Korkcambiums ganz allgemein von großem Interesse, denn es ist bisher noch nicht beobachtet worden, daß in vitro gezüchtete Segmente ein Abschlußgewebe regenerieren. Diese Korkbildung ist für die weitere Entwicklung der Kulturen nach dem Auspflanzen aus den Reagenzgläsern von entscheidender Bedeutung, weil durch sie jegliche Infektionsgefahr von vornherein ausgeschlossen ist.

Zusammenfassung

1. Pelargonium zonale

Naphthyl-3-essigsäure(NAA)-Gaben von 0—0,1 mg/l bewirken an *Pelargonium*-Segmenten die Ausbildung von Kallus aus dem Cambium und Mark in ansteigendem Maße. Aus diesem Kallus entwickeln sich Wurzeln, deren Zahl bei einer Addition von 0,1 mg/l NAA das Optimum erreicht. NAA in Konzentrationen von 0,1—0,8 mg/l unterdrücken Kallus-

bildung aus dem Cambium und bewirken das Auftreten von Kallus aus den subepidermalen Randzellen des Segmentes. Die in diesen Versuchsreihen gebildeten Wurzeln entstammen dem subepid. Kallus, sind aber dünn und wachsen nicht mehr in das Substrat hinein.

Es war nicht möglich, die Sproßbildung durch Zugabe von Adenin, Adenosin und Guanin anzuregen, ebenso bewirkten verschiedene Pflanzenextrakte keine Sproßbildung oder gesteigertes Wachstum der Kulturen.

Die Zugabe von Phosphat in Konzentrationen von 50 bzw. 100 mg/l bewirkt an *Pelargonium* kein Auftreten von Sprossen, auch die Zahl der durch NAA gebildeten Wurzeln bleibt durch Phosphat unbeeinflußt, das Phosphat hat jedoch auf *Pelargonium* einen toxischen Einfluß und führt zum Absterben der Kulturen unter Braunfärbung.

2. *Cyclamen persicum*

Die Zugabe von NAA in Konzentrationen bis zu 0,2 mg/l ruft an *Cyclamen*-Segmenten Sproßbildung hervor. NAA 0,4—3,0 mg/l bewirkt in ansteigendem Verhältnis die Ausbildung von Wurzeln, NAA 2,0 bis 10 mg/l verursacht starke Kallusbildung an der Oberfläche des Segmentes.

Durch Adenin werden die Segmente zur Ausbildung von Sprossen angeregt. Optimal ist ein Zusatz von 120 mg/l Adenin. Adenosin hat keinen sproßbildenden Effekt, wohl aber Guanin, das ungelöst und in Verbindung mit Ammoniumnitrat und Arginin gegeben wurde. In dieser Kombination erhöht Guanin die Anzahl der gebildeten Sprosse p. Segm. von 1 auf 9. Unter dem Einfluß von Guanin geht die Sproßbildung anders vor sich als in den übrigen Versuchsreihen.

Der Zusatz von Phosphat begünstigt an Segmenten von *Cyclamen* weder die Sproß- noch Wurzel- noch Kallusbildung.

Cyclamenkulturen, die nach etwa 100 Tagen aus den Reagenzgläsern herausgenommen und in Holzkästen in Gartenerde eingepflanzt wurden, entwickelten sich größtenteils zu normalen Pflanzen.

Herrn Privatdozent Dr. E. Haustein danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für ständige Förderung und Hilfe, sowie Herrn Prof. Dr. J. Schwemmle für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Botanischen Institut Erlangen und für finanzielle Unterstützung.

Literatur

Galston, A. W., and M. Hand: Adenin as a growth factor for etiolated peas and its relation to the thermal inactivation of growth. Arch. of Biochem. **22**, No 3 (1949). — Gautheret, R. J.: Manual Technique de Culture des Tissues Végétaux. Paris: Masson et Cie. 1942. — Hare, D., and H. Kersten: Effect of ultraviolet radiation on IAA. Plant Physiol. **12**, 509 (1937). — Henrickson, C. E.: The flowering of sunflower-explants in aseptic cultures. Plant Physiol. **29**, 536 (1954). —

Hoagland, D. R.: Lectures on the inorganic plant nutrition. Waltham, Mass. U.S.A. 1948. — Newcombe, E.: Tobacco callus respiration and its responses to 2,4 DNP. Amer. J. Bot. **37**, 264 (1950). — Skoog, F.: Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Amer. J. Bot. **31**, 19 (1944). — Plant Growth Substances. Wisconsin: Univ. of Wisconsin. 1951. — Skoog, F., and C. Miller: Chemical control of bud-formation in tobacco stem segments. Amer. J. Bot. **40**, 768 (1953). — Skoog, F., and Ch. Tsui: Chemical control of growth and bud-formation in tobacco stem segments and callus cultures in vitro. Amer. J. Bot. **35**, 782 (1948). — White, P. R.: Separation from yeast of material essential for growth of excised tomato roots. Plant Physiol. **12**, 777 (1937). — Sucrose versus dextrose as carbohydrate sources for excised tomato roots. Plant Physiol. **15**, 335 (1940). — A Handbook of Plant Tissue Culture. New York: The J. Catell Press 1943. — Plant tissue culture 1. Ann. of Biochem. **2**, 615 (1943). — Plant tissue culture 2. Bot. Review **12**, 521 (1946). — Wiggans, S.: Growth and organformation in callus tissues derived from *Daucus carota*. Amer. J. Bot. **41**, 321 (1954).

Dr. Lucie Mayer-Hörster, Lübeck, Moislinger Allee 21

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Physik

Ein Lehrbuch zum Gebrauch neben Vorlesungen.

Von Dr. **Chr. Gerthsen,** Professor an der Technischen Hochschule Karlsruhe. Vierte Auflage. Mit 647 Abbildungen. XV, 545 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 29.80

Inhaltsübersicht: Einleitung. — Längen- und Zeitmessungen. — Grundlagen der Mechanik des Massenpunktes. — Energie und Impuls. — Mechanik der starren Körper. — Mechanik der deformierbaren Körper. — Allgemeine Schwingungslehre. — Wellenlehre und Akustik. — Temperatur und Wärmemenge. — Die Hauptsätze der Wärmelehre. — Stoffe in verschiedenen Aggregatzuständen. — Elektrostatik und Magnetostatik. — Stationäre Ströme und Stromquellen. — Statische und langsam veränderliche Magnetfelder und ihre Wirkungen auf Ströme und bewegte elektrische Ladungen. — Materie in Magnetfeldern. — Technische Anwendungen des Induktionsgesetzes. — Elektromagnetische Schwingungen und Wellen. — Korpuskularstrahlen und Gasentladungen. — Struktur der Atome. Radioaktivität und Kernphysik. — Geometrische Optik. — Wellenoptik. — Die Lichtstrahlung. — Atombau und Spektren. — Geometrische Elektronenoptik. — Wellenmechanik. — Anhang. Wichtige physikalische Konstanten. Verzeichnis der Tabellen. — Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Die Physik der Hochpolymeren

Herausgegeben von **H. A. Stuart**, o. Professor für chemische Physik an der Universität Mainz. In vier Bänden.

Im April 1956 erschien:

Vierter Band:

Theorie und molekulare Deutung technologischer Eigenschaften von hochpolymeren Werkstoffen

Mit 367 Textabbildungen. XX, 667 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 89.—

Inhaltsübersicht: **Linear Deformation Behaviour of High Polymers.** By J. D. Ferry, A. J. Staverman, F. Schwarzl and R. S. Stein. — **Non Linear Deformation Behaviour of High Polymers.** By A. J. Staverman and F. Schwarzl. — **Bruchspannung und Festigkeit von Hochpolymeren.** Von F. Schwarzl und A. J. Staverman. — **Kritischer Überblick über die technologischen Prüfmethoden.** Von W. Meskat, O. Rosenberg, F. Schwarzl und A. J. Staverman. — **The Structure and Mechanical Properties of Rubberlike Materials.** By L. R. G. Treloar and J. P. Berry. — **Structure and Mechanical Properties of Plastics.** By J. D. Ferry. — **Struktur und mechanische Eigenschaften von Faserstoffen.** Von W. Kast, W. Meskat, O. Rosenberg und A. K. van der Vegt. — **Struktur und elektrische Eigenschaften.** Von F. Würstlin und H. Thurn. — **Die Wirkung von Weichmachern und ihre molekulare Deutung.** Von E. Jenckel. — **Vergleichende Betrachtungen zum Zusammenhang zwischen der molekularen Struktur und den makroskopischen Eigenschaften von Körpern aus Fadenmolekülen.** Von H. F. Mark und H. A. Stuart. — **Namenverzeichnis.** — **Sachverzeichnis.**

Erster Band:

Die Struktur des freien Moleküls

Allgemeine physikalische Methoden zur Bestimmung der Struktur von Molekülen und ihre wichtigsten Ergebnisse. Von H. A. Stuart, o. Professor für chemische Physik an der Universität Mainz. Mit 189 Abbildungen. XXI, 609 Seiten Gr.-8°. 1952. Ganzleinen DM 69.—

Zweiter Band:

Das Makromolekül in Lösungen

Bearbeitet von H. Buchholz-Meisenheimer, R. M. Fuoss, J. Hengstenberg, W. Jost, J. Juilfs, G. Kortüm, O. Kratky, A. Münster, A. Peterlin, G. Porod, G. Schramm, G. V. Schulz, U. P. Strauss, H. A. Stuart. Mit 323 Textabbildungen. XX, 782 Seiten Gr.-8°. 1953. Ganzleinen DM 89.60

Dritter Band:

Ordnungszustände und Umwandlungserscheinungen in festen hochpolymeren Stoffen

Bearbeitet von W. Brenschede, E. Jenckel, W. Kast, O. Kratky, A. Münster, G. Porod, E. Schauenstein, A. G. Smekal, A. J. Staverman, H. A. Stuart, E. Treiber, F. Würstlin. Mit 370 Textabbildungen. XVI, 693 Seiten Gr.-8°. 1955. Ganzleinen DM 89.—

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegt ein Prospekt des Springer-Verlages, Berlin - Göttingen - Heidelberg, und ein Prospekt des Springer-Verlages, Wien, bei

Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany